

29.06.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 18 AUG 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

2000年 3月16日

出願番号
Application Number:

特願2000-074757

出願人
Applicant (s):

協和醗酵工業株式会社

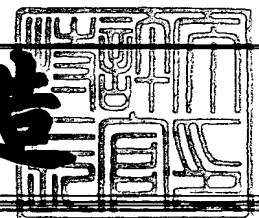
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3060509

【書類名】	特許願
【整理番号】	H12-0541T4
【提出日】	平成12年 3月16日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C12N 15/00
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会 社 東京研究所内
【氏名】	佐々木 克敏
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会 社 東京研究所内
【氏名】	白石 紀彦
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会 社 東京研究所内
【氏名】	夏目 歩
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会 社 東京研究所内
【氏名】	山田 陽史
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会 社 東京研究所内
【氏名】	中川 智
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会 社 東京研究所内
【氏名】	関根 進

【特許出願人】

【識別番号】 000001029
【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社
【代表者】 平田 正

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第183437号
【出願日】 平成11年 6月29日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 有用ポリペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)および(h)からなる群より選ばれるポリペプチドであり、かつポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する活性を有するポリペプチドを有効成分として含有する、糖鎖合成剤。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号1記載のアミノ酸配列の41番目から397番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

(c) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(d) 配列番号2記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

(e) 配列番号3記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(f) 配列番号3記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

(g) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(h) 配列番号4記載のアミノ酸配列の62番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

【請求項2】 ポリペプチドが、請求項1記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する活性を有するポリペプチドである、請求項1記載の糖鎖合成剤。

【請求項3】 ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する活性が、 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性である、請求項1または2記載の糖鎖合成剤。

【請求項4】 以下の(a)、(b)、(c)および(d)からなる群より選ばれるポリペプチド。

(a) 配列番号3記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号3記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

(c) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(d) 配列番号4記載のアミノ酸配列の62番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

【請求項5】 配列番号4記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に参与する活性を有するポリペプチド。

【請求項6】 以下の(a)または(b)のポリペプチドであり、かつポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に参与する活性を有するポリペプチド。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列の41番目から397番目のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1記載のアミノ酸配列の1番目から33番目のアミノ酸配列を含まないポリペプチド

(b) 配列番号2記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含まないポリペプチド

【請求項7】 ポリペプチドが、請求項6記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に参与する活性を有するポリペプチド。

【請求項8】 ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に参与する活性が、 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性である、請求項4～7いずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項9】 ポリペプチドの β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に β 1,3結合でN-アセチルグルコサミンを転移する活性である請求項8記載のポリペプチド。

【請求項10】 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が、i) N-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc) またはラクトース (Gal β 1-4Glc)、
ii) N-アセチルラクトサミンまたはラクトース構造を非還元末端に有するオリ

ゴ糖、およびiii) N-アセチルラクトサミンまたはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質の非還元末端に存在するガラクトース残基に、 $\beta 1,3$ 結合でN-アセチルグルコサミンを転移する活性である請求項8または9記載のポリペプチド。

【請求項11】 以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)および(h)からなる群より選ばれるポリペプチドであり、かつポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する活性を有する糖転移酵素。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号1記載のアミノ酸配列の41番目から397番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

(c) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(d) 配列番号2記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

(e) 配列番号3記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(f) 配列番号3記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

(g) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(h) 配列番号4記載のアミノ酸配列の62番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

【請求項12】 ポリペプチドが、請求項11記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する活性を有するポリペプチドである、請求項11記載の糖転移酵素。

【請求項13】 請求項4～10のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNA。

【請求項14】 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項15】 請求項13または14記載のDNAを含有する、炎症、癌

または癌転移検出剤。

【請求項16】 請求項13または14記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

【請求項17】 組換え体DNAが、プラスミドpAMo-G4-2、pAMo-G7、pAMoF2-G4、pVL1393-F2G4、pBS-G4-2およびpT7B-G7からなる群より選ばれるプラスミドである、請求項16記載の組換え体DNA。

【請求項18】 請求項16または17記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。

【請求項19】 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、非ヒトトランスジェニック動物およびトランスジェニック植物からなる群から選ばれる形質転換体である、請求項18記載の形質転換体。

【請求項20】 微生物が、Escherichia属に属する微生物である、請求項19記載の形質転換体。

【請求項21】 Escherichia coli MM294/pBS-G3(FERM BP-6694)、Escherichia coli MM294/pBS-G4(FERM BP-6695)、およびEscherichia coli MM294/pT7B-G7(FERM BP-6696)。

【請求項22】 動物細胞が、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞およびヒト白血病細胞からなる群から選ばれる動物細胞である、請求項19記載の形質転換体。

【請求項23】 昆虫細胞が、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞およびカイコの卵巣細胞からなる群から選ばれる昆虫細胞である、請求項19記載の形質転換体。

【請求項24】 請求項4～10のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製

造法。

【請求項 25】 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞または昆虫細胞からなる群から選ばれる形質転換体である、請求項 24 記載の製造法。

【請求項 26】 請求項 4～10 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA を保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該ポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【請求項 27】 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、請求項 26 記載の製造法。

【請求項 28】 請求項 4～10 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA を保有するトランスジェニック植物を栽培し、該ポリペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【請求項 29】 請求項 4～10 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA を用い、in vitroでの転写・翻訳系により該ポリペプチドを合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【請求項 30】 請求項 1 または 2 記載の糖鎖合成剤を酵素源として用い、
 (a) 該酵素源、
 (b) i) N-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc)、Gal β 1-3GlcNAc または ラクトース (Gal β 1-4Glc)、 ii) N-アセチルラクトサミン、Gal β 1-3GlcNAc または ラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、 および iii) N-アセチルラクトサミン、Gal β 1-3GlcNAc または ラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質、および

(c) ウリジン-5'-ニリン酸 N-アセチルグルコサミン
 を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のガラクトース残基に β 1,3 結合で N-アセチルグルコサミンが付与された糖鎖または複合糖質を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とす

る、該糖鎖または複合糖質の製造法。

【請求項 3 1】 請求項 3 0 記載の方法により得られる N-アセチルグルコサミンが付与された糖鎖または複合糖質を受容基質として用い、

- (a) 該受容基質、
- (b) GlcNAc β 1,4-ガラクトース転移酵素、および
- (c) ウリジン-5'-ニリン酸ガラクトース

を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質の非還元末端の N-アセチルグルコサミン残基に β 1,4結合でガラクトースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該ガラクトースが付与された糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該ガラクトースが付与された該糖鎖または複合糖質の製造法。

【請求項 3 2】 請求項 1 または 2 記載の糖鎖合成剤を酵素源として用い、

- (a) 該酵素源、
- (b) GlcNAc β 1,4-ガラクトース転移酵素、
- (c) i) N-アセチラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc)、Gal β 1-3GlcNAc または ラクトース (Gal β 1-4Glc)、 ii) N-アセチラクトサミン、Gal β 1-3GlcNAc または ラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、 iii) N-アセチラクトサミン、Gal β 1-3GlcNAc または ラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質、および iv) 請求項 3 0 または 3 1 記載の方法により得られる糖鎖または複合糖質からなる群より選ばれる受容基質、
- (d) ウリジン-5'-ニリン酸 N-アセチラクトサミン、および
- (e) ウリジン-5'-ニリン酸ガラクトース

を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質の非還元末端にポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖が付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖が付与された糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖が付与された該糖鎖または複合糖質の製造法。

【請求項 3 3】 請求項 1 または 2 記載の糖鎖合成剤の有効成分であるポリペプチドをコードする DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA を

保有する形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中に、 $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ 構造を有する糖、 $(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3)_n\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 構造を有し n が1以上である糖、および $(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3)_n\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ 構造を有し n が1以上である糖からなる群より選ばれる糖よりなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

【請求項34】 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞または昆虫細胞である、請求項33記載の糖鎖または複合糖質の製造法。

【請求項35】 請求項1または2記載の糖鎖合成剤の有効成分であるポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、 $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ 構造を有する糖、 $(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3)_n\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 構造を有し n が1以上である糖、および $(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3)_n\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ 構造を有し n が1以上である糖からなる群より選ばれる糖よりなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

【請求項36】 請求項1または2記載の糖鎖合成剤の有効成分であるポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、 $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ 構造を有する糖、 $(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3)_n\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 構造を有し n が1以上である糖、および $(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3)_n\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ 構造を有し n が1以上である糖からなる群より選ばれる糖よりなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

【請求項37】 複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプチドグリカン、およびステロイド化合物等に糖

鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である、請求項30～36のいずれか1項に記載の製造法。

【請求項38】 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、請求項35記載の製造法。

【請求項39】 請求項13または14記載のDNA、または配列番号8記載の塩基配列を有するDNAを用い、ハイブリダイゼーション法により、配列番号1～4いずれか1つに記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

【請求項40】 配列番号4記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの有する塩基配列の連続した6～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドの誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド。

--【請求項4-1】 DNAが、配列番号8記載の塩基配列を有するDNAである請求項40記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項42】 オリゴヌクレオチドの誘導体が、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3' - P5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2' - O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるオリゴ

ヌクレオチド誘導体である、請求項40または41記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項43】 請求項4～10のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの有する塩基配列の連続した6～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドの誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法により、請求項4～10のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

【請求項44】 請求項39または43記載の方法を用いた、炎症、癌または癌転移の検出法。

【請求項45】 請求項13または14記載のDNA、配列番号8の塩基配列を有するDNAの有する塩基配列の連続した6～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドの誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチドを用い、請求項4～10のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

【請求項46】 請求項4～10のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの有する塩基配列の連続した6～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドの誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド。

【請求項47】 請求項4～10のいずれか1項に記載のポリペプチドを認識する抗体。

【請求項48】 請求項47記載の抗体を用いる、請求項4～10のいずれか1項に記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

【請求項49】 請求項47記載の抗体を用い、請求項4～10のいずれか1項に記載のポリペプチドを検出することを特徴とする、免疫組織染色法。

【請求項50】 請求項47記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

【請求項51】 請求項47記載の抗体を含有する、炎症、癌または癌転移の診断薬。

【請求項52】 請求項4～10のいずれか1項に記載のポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有する β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を変動させる化合物のスクリーニング法。

【請求項53】 請求項4～10のいずれか1項に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖を認識する抗体またはレクチンを用い、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

【請求項54】 請求項4～10のいずれか1項に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、請求項47記載の抗体を用い、該ポリペプチド含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

【請求項55】 請求項4～10のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーターDNA。

【請求項56】 プロモーターDNAが、白血球細胞、小腸細胞、大腸細胞、脾臓細胞、胃細胞、大腸癌細胞、脾癌細胞および胃癌細胞から選ばれる細胞で機能しているプロモーターである、請求項55記載のプロモーターDNA。

【請求項57】 プロモーターDNAが、ヒトまたはマウス由来のプロモーターDNAである、請求項55または56記載のプロモーターDNA。

【請求項58】 請求項55～56のいずれか1項に記載のプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを用いて動物細胞を形質転換し、該形質転換体と被検試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物の含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

【請求項59】 レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子より選ばれる遺伝子である、請求項58記載のスクリーニング法。

【請求項60】 請求項52～54、58および59のいずれか1項に記載

のスクリーニング法により得られる化合物。

【請求項61】 請求項4～10のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAを欠損または変異させたノックアウト動物。

【請求項62】 ノックアウト動物がマウスである、請求項61記載のノックアウト動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドを有効成分として含有する糖鎖合成剤、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを含有する炎症、癌または癌転移検出剤、該DNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA、該組換え体DNAを保有する形質転換体、該形質転換体を利用した該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドを用いた糖鎖または複合糖質の製造法、該形質転換体を利用した糖鎖または複合糖質の製造法、該ポリペプチドをコードするDNAより得られるオリゴヌクレオチドを用いた炎症、癌または癌転移の検出法、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いた免疫組織染色法、該抗体を含有する免疫組織染色剤、炎症、癌または癌転移の診断薬、該ポリペプチドの β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を変動させる化合物のスクリーニング法、該遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法、該遺伝子の転写を司るプロモーターDNA、該プロモーターDNAによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法、これらのスクリーニング法により得られる化合物、および該遺伝子を欠損または変異させたノックアウト動物等に関する。

【0002】

【従来の技術】

糖鎖は、発生・分化、細胞認識といった生命現象に関与しているほか、炎症、癌、感染症、自己免疫疾患、およびその他多くの病気の発生、進行に深く関係していると考えられている〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編、グリコバイオロジーシリーズ①～⑥、講談社、(1993年)、Glycobiology, 3, 97 (1993)〕。

【0003】

糖鎖は、タンパク質や脂質に付加して、糖タンパク質、プロテオグリカン、または糖脂質として存在するほか、オリゴ糖としても存在する。

Gal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に β 1,3-結合でN-アセチルグルコサミンを転移する活性を有する酵素で、GlcNAc β 1-3Gal構造を有する糖鎖の合成に関与する。GlcNAc β 1-3Gal構造を有する糖鎖は、糖タンパク質のN-グリコシド結合型糖鎖やO-グリコシド結合型糖鎖中に存在するほか、ネオラクト系やラクト系の糖脂質の糖鎖中やオリゴ糖中にも存在する。例えば、GlcNAc β 1-3Gal構造を有するオリゴ糖としては、ヒトの乳中に存在するラクト-N-ネオテトラオース (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) やラクト-N-テトラオース (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)、あるいはそれらを母核とする様々なオリゴ糖があげられる [Acta Paediatrica, 82, 903 (1993)]。GlcNAc β 1-3Gal構造は、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の構成要素にもなっている。ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖は、N-アセチルラクトサミンが β 1,3結合で繰り返し結合した構造 [(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3) $_n$; n は2以上] を有する糖鎖で、糖タンパク質のN-グリコシド結合型糖鎖やO-グリコシド結合型糖鎖中に存在するほか、糖脂質の糖鎖中やオリゴ糖中にも存在する。

【0004】

Gal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素に関しては、これまでに部分精製の報告がある [J. Biol. Chem., 268, 27118 (1993)、J. Biol. Chem., 267, 2994 (1992)、J. Biol. Chem., 263, 12461 (1988)、Jpn. J. Med. Sci. Biol., 42, 77 (1989)]。また、これまでに2種のGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の遺伝子がクローン化されている [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 14294-14299 (1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 406-411 (1999)]。

さらに別のGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素が存在するかどうかについては明らかになっていない。

【0005】

α 1,3-フコース転移酵素においては、これまでに6種の酵素がクローン化され

ている [Kukowska-Latalloら: *Genes & Dev.* 4, 1288-1303 (1990)、Goelzら: *Cell* 63, 1349-1356 (1990)、Loweら: *J. Biol. Chem.* 266, 17467-17477 (1991)、Kumarら: *J. Biol. Chem.* 266, 21777-21783 (1991)、Westonら: *J. Biol. Chem.* 267, 4152-4160 (1992)、Westonら: *J. Biol. Chem.* 267, 24575-24584 (1992)、Koszdinら: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 152-157 (1992)、Sasakiら: *J. Biol. Chem.* 269, 14730-14737 (1994)、Natsukaら: *J. Biol. Chem.* 269, 16789-16794 (1994)、Kudoら: *J. Biol. Chem.* 273, 26729-26738 (1998)]。これらの $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素は、一部重複した受容基質特異性を示すが、厳密にはそれぞれ異なる受容基質特異性を示す。また、それぞれの酵素は、細胞特異的あるいは時期特異的に発現することから、それぞれ別々の機能を担っていると考えられる。

【0006】

GlcNAc β 1-3Gal構造を有する糖鎖は非常にたくさん存在することから、Gal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素に関しても、 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素と同様に、受容基質特異性や発現組織が異なる複数の酵素が存在し、それぞれ別の機能を担っている可能性が高いと考えられる。したがって、これまでにクローン化された2種の酵素とは異なるGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素をクローン化し、受容基質特異性や発現分布を調べ、生物学的機能や疾患との関係を明らかにすることは重要な課題である。

【0007】

上述したように、ヒトの乳中にはラクトーN-ネオテトラオース (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) やラクトーN-テトラオース (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)、あるいはそれらを母核とする構造を有する様々なオリゴ糖が存在することが知られている [Acta Paediatrica, 82, 903 (1993)]。該オリゴ糖は共通してGlcNAc β 1-3Gal構造を有している。また、該オリゴ糖の中にはポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を有するオリゴ糖も含まれる。これらのオリゴ糖には、乳児がウイルスや微生物に感染するのを防ぐ働きや、毒素を中和する働きがあると考えられている。また、善玉の腸内細菌であるビフィズス菌の増殖を促す活性もある。一方、ウシやマウスなどの動物の乳中に存在するオリゴ糖の種類は少なく

、大部分がラクトースであり、ヒト乳中に存在する上記オリゴ糖はほとんど存在しない。

【0008】

ヒトの乳中に含まれる上記オリゴ糖、あるいはそれらが含まれたミルクを効率よく生産することができれば、産業上非常に有用と思われる。ヒトの乳中に含まれる上記オリゴ糖の合成に関与するGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の遺伝子が取得できれば、上記オリゴ糖の効率的な合成に使用可能と考えられるが、該酵素は明らかになっていない。

【0009】

GlcNAc β 1-3Gal構造を有する糖鎖の中で、特にポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖は、多くの機能性糖鎖（セレクトインリガンド糖鎖、微生物やウイルスの受容体糖鎖、SSEA-1糖鎖、癌関連糖鎖など）の骨格糖鎖となっており、胚発生、細胞分化、あるいは炎症や癌などの疾患と深く関わっている。また、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖は、糖タンパク質の安定化にも重要な役割を果たしている（後述）。

【0010】

それぞれの場面で機能しているポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与するGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は異なる可能性があるため、これまでにクローン化された2種の酵素とは異なるGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素をクローン化し、受容基質特異性や発現分布などからそれぞれの酵素の機能を推定することは重要な課題である。

【0011】

以下、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成、機能、応用について記す。

ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖は、GlcNAc β 1,4-ガラクトース転移酵素とGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が交互に働くことにより合成される。Gal β 1,4-ガラクトース転移酵素に関しては、これまでに4種類の酵素（Gal β 1,4-T1、Gal β 1,4-T2、Gal β 1,4-T3、Gal β 1,4-T4）の遺伝子がクローン化され、それぞれの酵素の受容基質特異性が解析されている

[J. Biol. Chem. 272, 31979-31991(1997)、J. Biol. Chem. 273, 29331-29340

(1997)]。

【0012】

したがって、GlcNAc β 1,4-ガラクトース転移酵素とGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素を用いて、*in vitro*でポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖を合成することができる。また、GlcNAc β 1,4-ガラクトース転移酵素遺伝子とGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子を細胞中で共発現することにより、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖あるいは該糖鎖が付加した複合糖質を生産することができる。GlcNAc β 1,4-ガラクトース転移酵素はほとんどの細胞で発現しているため、Gal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子単独を細胞中で発現することによっても、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖あるいは該糖鎖が付加した複合糖質を生産することができる。

【0013】

ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖中のガラクトース残基には、しばしばN-アセチルグルコサミンが β 1,6結合で結合し、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4GlcNAcのような分岐鎖を有するポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖が合成される。この分岐部分の β 1,6結合したN-アセチルグルコサミンを転移する糖転移酵素が β 1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (I-branching enzyme) である。本酵素遺伝子も既にクローン化されている。直鎖状のポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖 (i抗原) は抗 i 抗体により、分岐鎖を有するポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖 (I抗原) は抗 I 抗体により特異的に認識される [J. Biol. Chem., 254, 3221 (1979)]。

【0014】

直鎖型または分岐型のポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖上には、フコース、シアル酸、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトースなどの糖、または硫酸基などが付加し、細胞特異的あるいは時期特異的に様々な糖鎖 (機能性糖鎖、血液型糖鎖、癌関連糖鎖など) が形成される [木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編, グリコバイオロジーシリーズ①～⑥, 講談社, (1993年)]。

【0015】

顆粒球、単球、または活性化T細胞上には、糖鎖の末端にシアリルルイスx糖

鎖 [NeuAc α 2-3Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc] を有するポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が存在していることが知られており、これらの糖鎖は接着分子であるE-セレクトインやP-セレクトインのリガンドとして機能し、これらの白血球が炎症部位へ集積するのに関与していると考えられている〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編，グリコバイオロジーシリーズ①～⑥，講談社，（1993年）〕。

【0016】

また、大腸癌などの癌細胞上にも、末端にシアリルルイスx糖鎖やシアリルルイスa糖鎖 [NeuAc α 2-3Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc] を有するポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が存在していることが知られており、これらの糖鎖もE-セレクトインやP-セレクトインのリガンドとして機能し、癌の転移に関与していることが示唆されている〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編，グリコバイオロジーシリーズ①～⑥，講談社，（1993年）〕。

【0017】

ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の構造は、胚発生、細胞分化、または細胞の癌化の過程で変化することが知られている〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編，グリコバイオロジーシリーズ①～⑥，講談社，（1993年）〕。ヒトの胎児の赤血球では直鎖型のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が発現しているのに対し、成人の赤血球では分岐型のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が発現する〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編，グリコバイオロジーシリーズ①「糖鎖の多様な世界」、講談社、1993年〕。これら赤血球上のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の末端には、ABO式の血液型抗原が発現している。分岐したポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖のそれぞれの末端に血液型抗原が発現されると多価の抗原となり、血液型糖鎖に対する抗体との結合能は、直鎖型の抗原に比較して 10^3 以上も増加する。

【0018】

マウスの初期胚の発生過程においては、一連の糖鎖抗原が規則正しく発現されることが知られている。SSEA-1 (stage specific embryonic antigen-1) 抗原は、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖末端に存在するルイスx糖鎖 [Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc] であるが、この抗原の発現は8細胞期に始まり、桑実胚でピー

クとなり、胚盤胞期以降は徐々に消失していく〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編、グリコバイオロジーシリーズ③「細胞社会のグリコバイオロジー」、講談社、1993年〕。桑実胚期は、それまで細胞分裂による単純な数的増加を繰り返してきた胚細胞が、初めて分化した「形態」をもった胚盤胞の段階へ移行していく移行期にあたる。桑実胚の細胞は胚盤胞を形成する直前に互いに緊密に寄り集まり、細胞緊密化 (cell compaction) を起こす。SSEA-1 抗原を有するオリゴ糖を添加すると、この細胞緊密化は阻害され、その後の正常な発生も阻害される〔J. Exp. Med., 160, 1591 (1984)〕。また、マウスのテラトカルシノーマ細胞の接着が、抗SSEA-1 抗体により阻害されることも知られている〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編、グリコバイオロジーシリーズ③「細胞社会のグリコバイオロジー」、講談社、1993年〕。以上のことは、SSEA-1 抗原が接着分子あるいは糖鎖シグナルとして作用し、初期胚の発生に重要な役割を果たしていることを示している。

【0019】

癌細胞では、対応する正常細胞に比較して、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を多く発現することが知られている〔J. Biol. Chem., 259, 10834 (1984)、J. Biol. Chem., 261, 10772 (1986)、J. Biol. Chem., 266, 1772 (1991)、J. Biol. Chem., 267, 5700 (1992)〕。NIH3T3細胞にN-rasプロトオンコジーンを発現させると、細胞表面のN-結合型糖鎖の分子量が増加し、細胞は浸潤能を獲得するが、この時、N-結合型糖鎖中のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の量が増加するとともに、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する β 1,4-ガラクトース転移酵素と β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の活性が増加していることが知られている〔J. Biol. Chem., 266, 21674 (1991)〕。

【0020】

ガレクチンは、 β -ガラクトシドに親和性を有する一群のレクチンで、細胞の接着や情報伝達に関与し、癌などの疾患との関連も示唆されている〔Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 9, 9 (1997)〕。哺乳類ではこれまでに10種類のもが知られている。このうちガレクチン-1および-3は、直鎖上のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖と高親和性で結合することが知られており、それ

らの糖鎖を含有する特定の糖タンパク質が、これらのガレクチンのリガンドであると推定されている [Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 9, 9 (1997)、Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 9, 47 (1997)]。

【0021】

末端にシアル酸が付加したポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖は、マイコプラズマや微生物の受容体となっている [Acta Paediatrica, 82, 903 (1993)]。

このように、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖は、多くの機能性糖鎖（セレクチンリガンド糖鎖、微生物やウイルスの受容体糖鎖、SSEA-1糖鎖、癌関連糖鎖など）や血液型糖鎖の骨格糖鎖を形成し、それらの糖鎖を効率的に提示するのに重要な役割を果たしている。

【0022】

シアリルルイスx糖鎖を有するポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖は、セレクチンのアンタゴニストとして、抗炎症効果あるいは癌転移抑制効果を有する医薬品となることが期待される。

ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖上に多価（4個）のシアリルルイスx糖鎖（4糖）が結合したオリゴ糖では、多価にしていないシアリルルイスxオリゴ糖（4糖）に比較して、1/100以下の低濃度でセレクチンアンタゴニストとしての活性を示すことが知られている [J. Exp. Med., 182, 1133 (1995)、Glycobiology, 6, 65 (1996)、Glycobiology, 7, 453 (1997)、Eur. J. Immunol., 27, 1360 (1997)]。これらのオリゴ糖のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖部分の合成には、部分精製された β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素が利用されたが、この酵素の供給が律速となり、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を多量に合成することは難しい [Glycobiology, 7, 453 (1997)]。

【0023】

一方、化学合成によってもポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を合成可能であるが、その合成は非常に煩雑なステップを必要とする [Tetrahedron Letter, 24, 5223 (1997)]。

以上のことより、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の効率良い合成法が求められている。これまでにクローン化された2種のGal β 1,3-N-アセチルグルコサ

ミン転移酵素や該酵素遺伝子を利用することもできるが、目的に応じて基質特異性や機能の異なる別のGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素や該酵素遺伝子を用いた方が効率がよい場合があると考えられる。

【 0 0 2 4 】

ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖は、糖タンパク質の安定化にも重要である。lysosome associated membrane glycoprotein-1 (lamp-1) およびlysosome associated membrane glycoprotein-2 (lamp-2) は、リソソームに存在する糖タンパク質（一部は細胞表面にも存在する）で、リソソーム膜の内面をほとんどもれなく覆っている。lamp-1およびlamp-2には多くの糖鎖（いくつかはポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖を含む）が付加しており、lamp-1およびlamp-2がリソソーム中の加水分解酵素によって分解されるのを防いでいる。ヒトの前骨髄球細胞株であるHL-60をジメチルスルフォキシド (dimethyl sulfoxide) で処理すると、顆粒球系の細胞に分化するが、この分化の過程で、lamp-1およびlamp-2に付加するポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の数が増加し、それとともにlamp-1およびlamp-2の代謝速度（分解速度）が低下することが知られている [J. Biol. Chem., 265, 20476 (1990)]。

【 0 0 2 5 】

ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖はタンパク質の安定化に寄与していることから、任意のタンパク質に人為的にポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖を付加することにより、タンパク質を安定化できると考えられる。また、血中タンパク質の腎臓からのクリアランス速度は、タンパク質の実効分子量が大きいほど遅くなることから、任意のタンパク質に人為的にポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖を付加し、実効分子量を増加させることにより、腎臓からのクリアランス速度を低下させ、血中安定性を増加させることができると考えられる。さらに、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖を付加することにより、任意のタンパク質を特定の細胞にターゲティングできる可能性もある。

【 0 0 2 6 】

F9細胞をレチノイン酸で処理した場合や、Swiss 3T3細胞をTGF- β で処理した場合に、細胞の膜結合糖タンパク質の糖鎖にポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖

が付加することが示されている [J. Biol. Chem., 268, 1242 (1993), Biochim. Biophys. Acta., 1221, 330 (1994)]。

【0027】

NIH3T3細胞にN-rasプロトオンコジーンを発現させると、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する β 1,4-ガラクトース転移酵素と β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の活性が増加し、膜タンパク質のN-結合型糖鎖中のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖量が増加することが知られている [J. Biol. Chem., 266, 21674 (1991)]。T細胞株EL-4中でコア2 β 1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子を発現させると、細胞表面の膜タンパク質であるCD43、CD45、またはCD44の分子量が増加する [J. Biol. Chem., 271, 18732 (1996)]。これは、コア2 β 1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素により合成された糖鎖が、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素のよい基質となるためと考えられる。

【0028】

また、HL-60細胞を27℃で培養すると、lamp-1またはlamp-2に付加するポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の量が増加することが知られている [J. Biol. Chem., 266, 23185 (1991)]。

しかし、組換え糖タンパク質の生産に適した宿主細胞において、上述した方法が有効かどうかは定かではない。したがって、組換え糖タンパク質の生産に適した宿主細胞（例えばNamalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、CHO細胞など）のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成能を増加させる方法の開発は、産業上重要な課題である。これまでにクローン化された2種のGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子を利用することもできるが、目的に応じて基質特異性や機能の異なる別のGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子を用いた方が効率がよい場合があると考えられる。

【0029】

上述の炎症反応と癌転移の機構を考慮すると、白血球や癌細胞上のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の発現を抑制することによって、炎症反応を抑制したり癌転移を防止できることが期待される。白血球や癌細胞においてポリ-N-アセチル

ルラクトサミン糖鎖の合成に関与しているGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の遺伝子が取得できれば、該遺伝子の発現を抑制することにより、白血球や癌細胞におけるポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の発現を抑制できる可能性がある。

【0030】

また、白血球や癌細胞においてポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与しているGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の遺伝子が取得できれば、該遺伝子の発現量を調べたり、該遺伝子がコードするタンパク質の発現量を調べることにより、炎症性疾患や癌の悪性度を診断できる可能性がある。

特定の白血球や癌細胞においてポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与しているGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は異なることが考えられるため、これまでにクローン化された酵素とは異なる酵素をクローン化して調べる必要がある。

【0031】

細胞や組織の抽出液を酵素源とした酵素学的解析では、複数のGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素を発現している細胞や組織において発現しているGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の各々を特定すること、ならびにそれらのGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の各々についての酵素学的特性を明らかにすることはできない。

【0032】

特定のGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の発現を検出するためには、特異的抗体を用いた免疫的検出法か、遺伝子の塩基配列に基づいた検出法（例えばノーザンハイブリダイゼーション法やPCR法）を用いる必要がある。したがって、これまでにクローン化された2種の酵素とは異なるGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素をクローン化し、発現を比較する必要がある。

【0033】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、新規なGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドを利用し、抗炎症、抗感染症、癌転移抑制等の医薬品、乳製

品等の食品、および、タンパク質の改善法、炎症性疾患や癌の悪性度の診断法を提供することにある。

【0034】

【課題を解決するための手段】

本発明は、以下の(1)～(62)に関する。

(1) 以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)および(h)からなる群より選ばれるポリペプチドであり、かつポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する活性を有するポリペプチドを有効成分として含有する、糖鎖合成剤。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号1記載のアミノ酸配列の41番目から397番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(c) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(d) 配列番号2記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(e) 配列番号3記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号3記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(g) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h) 配列番号4記載のアミノ酸配列の62番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(2) ポリペプチドが、上記(1)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する活性を有するポリペプチドである、上記(1)の糖鎖合成剤。

(3) ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する活性が、 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性である、上記(1)または(2)の糖鎖合成剤。

(4) 以下の(a)、(b)、(c)および(d)からなる群より選ばれ

るポリペプチド。

- (a) 配列番号3記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (b) 配列番号3記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。
- (c) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (d) 配列番号4記載のアミノ酸配列の62番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(5) 配列番号4記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に参与する活性を有するポリペプチド。

(6) 以下の(a)または(b)のポリペプチドであり、かつポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に参与する活性を有するポリペプチド。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列の41番目から397番目のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1記載のアミノ酸配列の1番目から33番目のアミノ酸配列を含まないポリペプチド。

(b) 配列番号2記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含まないポリペプチド。

(7) ポリペプチドが、上記(6)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に参与する活性を有するポリペプチド。

(8) ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に参与する活性が、 $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性である、上記(4)～(7)いずれか1つに記載のポリペプチド。

(9) ポリペプチドの $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に $\beta 1,3$ 結合でN-アセチルグルコサミンを転移する活性である上記(8)のポリペプチド。

(10) $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が、i) N-アセチル

ラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc) またはラクトース (Gal β 1-4Glc)、ii) N-アセチルラクトサミンまたはラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、およびiii) N-アセチルラクトサミンまたはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質の非還元末端に存在するガラクトース残基に、 β 1,3結合でN-アセチルグルコサミンを転移する活性である上記(8)または(9)のポリペプチド。

(11) 以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)および(h)からなる群より選ばれるポリペプチドであり、かつポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する活性を有する糖転移酵素。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号1記載のアミノ酸配列の41番目から397番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(c) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(d) 配列番号2記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(e) 配列番号3記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号3記載のアミノ酸配列の45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(g) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h) 配列番号4記載のアミノ酸配列の62番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(12) ポリペプチドが、上記(11)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する活性を有するポリペプチドである、上記(11)の糖転移酵素。

(13) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNA。

(14) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ β 1,3-N-アセチ

ルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

(15) 上記(13)または(14)のDNAを含有する、炎症、癌または癌転移検出剤。

(16) 上記(13)または(14)のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(17) 組換え体DNAが、プラスミドpAMo-G4-2、pAMo-G7、pAMoF2-G4、pVL1393-F2G4、pBS-G4-2およびpT7B-G7からなる群より選ばれるプラスミドである、上記(16)の組換え体DNA。

(18) 上記(16)または(17)の組換え体DNAを保有する形質転換体。

(19) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、非ヒトトランスジェニック動物およびトランスジェニック植物からなる群から選ばれる形質転換体である、上記(18)の形質転換体。

(20) 微生物が、Escherichia属に属する微生物である、上記(19)の形質転換体。

(21) Escherichia coli MM294/pBS-G3(FERM BP-6694)、Escherichia coli MM294/pBS-G4(FERM BP-6695)、およびEscherichia coli MM294/pT7B-G7(FERM BP-6696)。

(22) 動物細胞が、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞およびヒト白血病細胞からなる群から選ばれる動物細胞である、上記(19)の形質転換体。

(23) 昆虫細胞が、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞およびカイコの卵巣細胞からなる群から選ばれる昆虫細胞である、上記(19)の形質転換体。

(24) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質

転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(25) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞または昆虫細胞からなる群から選ばれる形質転換体である、上記(24)の製造法。

(26) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該ポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(27) 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、上記(26)の製造法。

(28) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該ポリペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(29) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAを用い、in vitroでの転写・翻訳系により該ポリペプチドを合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(30) 上記(1)または(2)の糖鎖合成剤を酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) N-アセチルラクトサミン ($\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$)、 $\text{Gal}\beta 1\text{-3GlcNAc}$ またはラクトース ($\text{Gal}\beta 1\text{-4Glc}$)、 ii) N-アセチルラクトサミン、 $\text{Gal}\beta 1\text{-3GlcNAc}$ またはラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、 および iii) N-アセチルラクトサミン、 $\text{Gal}\beta 1\text{-3GlcNAc}$ またはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質、および

(c) ウリジン-5'-ニリン酸N-アセチルグルコサミン

を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のガラクトース残基に

β 1,3結合でN-アセチルグルコサミンが付与された糖鎖または複合糖質を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

(31) 上記(30)の方法により得られるN-アセチルグルコサミンが付与された反応産物を受容基質として用い、

- (a) 該受容基質、
- (b) GlcNAc β 1,4-ガラクトース転移酵素、および
- (c) ウリジン-5'-二リン酸ガラクトース

を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基に β 1,4結合でガラクトースが付与された糖鎖または複合糖質を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該ガラクトースが付与された糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該ガラクトースが付与された糖鎖または複合糖質の製造法。

(32) 上記(1)または(2)の糖鎖合成剤を酵素源として用い、

- (a) 該酵素源、
- (b) GlcNAc β 1,4-ガラクトース転移酵素、
- (c) i) N-アセチラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc)、Gal β 1-3GlcNAcまたはラクトース (Gal β 1-4Glc)、ii) N-アセチラクトサミン、Gal β 1-3GlcNAcまたはラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、iii) N-アセチラクトサミン、Gal β 1-3GlcNAcまたはラクトース構造を非還元末端に有する複合糖質、およびiv) 上記(30)または(31)の方法により得られる反応産物からなる群より選ばれる受容基質、

- (d) ウリジン-5'-二リン酸N-アセチラクトサミン、および

- (e) ウリジン-5'-二リン酸ガラクトース

を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質の非還元末端にポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖が付与された糖鎖または複合糖質を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖が付与された糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖が付与された該糖鎖または複合糖質の製造法。

(33) 上記(1)または(2)の糖鎖合成剤の有効成分であるポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中に、 $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-3GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Glc}$ 構造を有する糖、 $(\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-3})_n\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ 構造を有し n が1以上である糖、および $(\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-3})_n\text{Gal}\beta 1\text{-4Glc}$ 構造を有し n が1以上である糖からなる群より選ばれる糖よりなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

(34) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞または昆虫細胞である、上記(33)の糖鎖または複合糖質の製造法。

(35) 上記(1)または(2)の糖鎖合成剤の有効成分であるポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、 $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-3GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Glc}$ 構造を有する糖、 $(\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-3})_n\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ 構造を有し n が以上である糖、および $(\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-3})_n\text{Gal}\beta 1\text{-4Glc}$ 構造を有し n が1以上である糖からなる群より選ばれる糖よりなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

(36) 上記(1)または(2)の糖鎖合成剤の有効成分であるポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、 $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-3GlcNAc}$ 構造を有する糖、 $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Glc}$ 構造を有する糖、 $(\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-3})_n\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ 構造を有し n が1以上である糖、および $(\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-3})_n\text{Gal}\beta 1\text{-4Glc}$ 構造を有し n が1以上である糖からなる群より選ばれる糖よりなる糖鎖、または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

(37) 複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リボ多糖、ペプチドグリカン、およびステロイド化合物等に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である、上記(30)～(36)のいずれか1つに記載の製造法。

(38) 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、上記(35)の製造法。

(39) 上記(13)または(14)のDNA、または配列番号8記載の塩基配列を有するDNAを用い、ハイブリダイゼーション法により、配列番号1～4いずれか1つに記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

(40) 配列番号4記載アミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの有する塩基配列の連続した6～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドの誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド。

(41) DNAが、配列番号8記載の塩基配列を有するDNAである上記(40)のオリゴヌクレオチド。

(42) オリゴヌクレオチドの誘導体が、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3' - P5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine)で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2' - O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエト

キシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド誘導体である、上記(40)または(41)のオリゴヌクレオチド。

(43) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAの有する塩基配列の連続した6～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドの誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法により、上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

(44) 上記(39)または(43)の方法を用いた、炎症、癌または癌転移の検出法。

(45) 上記(13)または(14)のDNA、配列番号8記載の塩基配列を有するDNAの有する塩基配列の連続した6～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドの誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチドを用い、上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAの転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

(46) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAの有する塩基配列の連続した6～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドの誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド。

(47) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドを認識する抗体。

(48) 上記(47)の抗体を用いる、上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

(49) 上記(47)の抗体を用い、上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドを検出することを特徴とする、免疫組織染色法。

(50) 上記(47)の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

(51) 上記(47)の抗体を含有する、炎症、癌または癌転移の診断薬。

(52) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有する β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を変動させる化合物のスクリーニング法。

(53) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖を認識する抗体またはレクチンを用い、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

(54) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、上記(47)の抗体を用い、該ポリペプチド含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

(55) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーターDNA。

(56) プロモーターDNAが、白血球細胞、小腸細胞、大腸細胞、脾臓細胞、胃細胞、大腸癌細胞、脾癌細胞および胃癌細胞から選ばれる細胞で機能しているプロモーターである、上記(55)のプロモーターDNA。

(57) プロモーターDNAが、ヒトまたはマウス由来のプロモーターDNAである、上記(55)または(56)のプロモーターDNA。

(58) 上記(55)～(57)のいずれか1つに記載のプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを用いて動物細胞を形質転換し、該形質転換体と被検試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物の含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

(59) レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子より

選ばれる遺伝子である、上記(58)のスクリーニング法。

(60) 上記(52)～(54)、(58)および(59)のいずれか1つに記載のスクリーニング法により得られる化合物。

(61) 上記(4)～(10)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAを欠損または変異させたノックアウト動物。

(62) ノックアウト動物がマウスである、上記(61)のノックアウト動物。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0035】

【発明の実施の形態】

(1) GlcNAc β 1,3-ガラクトース転移酵素(β 3Gal-T1)のホモログ蛋白質をコードするDNAの取得、ならびに該DNAおよびオリゴヌクレオチドの製造

β 3Gal-T1(別名WM1)はGal β 1-3GlcNAc構造の合成に関与するGlcNAc β 1,3-ガラクトース転移酵素である[特開平6-181759]。遺伝子データベースから、Blast [Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)]、Frame Search法 [Compugen社製]等のプログラムを利用して、本酵素遺伝子と相同性のある遺伝子または本酵素とアミノ酸レベルで相同性を有する蛋白質をコードする可能性のある遺伝子を検索する。データベースとしてはGenBank等の公的なデータベースを利用することもできるし、私的なデータベースも利用できる。各種臓器または各種細胞から調製した一本鎖cDNAまたはcDNAライブラリーを鋳型にして、該当する配列に特異的なプライマーを用いてポリメラーゼ・チェーン・リアクション(Polymerase Chain Reaction; 以下、PCRと略記する) [モレキュラー・クローニング第2版およびPCR Protocols Academic Press (1990)]を行うことにより、該当する配列を有するDNAの存在を検出することができる。また、同様にして該当する配列を有するDNA断片を取得することができる。

【0036】

得られたDNA断片が不完全長の場合は、以下のようにしてその全長cDNAを得ることができる。

上記で取得したDNA断片をプローブとして、該DNAが存在することが確認された臓器または細胞由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、全長cDNAを取得することができる。

また、該DNAが存在することが確認された一本鎖cDNAまたはcDNAライブラリーを鋳型として、5' RACE法と3' RACE法を行うことにより、該当する配列を有するcDNAの5'末端側の断片と3'末端側の断片を取得することができる。両断片を連結することにより、全長cDNAを取得できる。

【0037】

各種臓器または各種細胞由来の一本鎖cDNAは、常法または市販されているキットに従って調製することができる。一例を以下に示す。

各種臓器または各種細胞から酸グアニジウム チオシアネート フェノールクロロホルム法 [Anal. Biochem. 162, 156-159] により全RNAを抽出する。必要に応じて、全RNAをデオキシリボヌクレアーゼ I (Life Technologies社製) で処理し、混入の可能性がある染色体DNAを分解する。得られた全RNA各々について、オリゴ(dT)プライマーまたはランダムプライマーを用いてSUPERSCRIPTTM Preamplification System for First Strand cDNA System (Life Technologies社) により一本鎖cDNAを合成する。一本鎖cDNAとしては、例えばヒト神経芽細胞腫細胞株SK-N-MCから上記の方法で作製した一本鎖cDNAをあげることができる。

【0038】

cDNAライブラリーは常法により作製することができる。cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1~38等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ギブコBRL (Gibco BRL) 社製] やザップーcDNA・シンセシス・キット [ZAP-

cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製〕を用いる方法等があげられる。各種臓器または各種細胞由来のcDNAライブラリーは、市販されているものを購入することによっても入手できる。

【0039】

cDNAライブラリーを作製するための、クローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express〔ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)〕、pBlue II SK(+)〔ヌクレック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)〕、λzap II (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11〔DNAクローニング、ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)〕、λTriplEx (クローンテック社製)、λExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pCD2〔モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)〕、pUC18〔ジーン (Gene), 33, 103 (1985)〕、pAMo〔J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)〕等をあげることができる。

【0040】

宿主微生物としては、大腸菌に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF'〔ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)〕、Escherichia coli C600〔Genetics, 39, 440 (1954)〕、Escherichia coli Y1088〔Science, 222, 778 (1983)〕、Escherichia coli Y1090〔Science, 222, 778 (1983)〕、Escherichia coli NM522〔J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)〕、Escherichia coli K802〔J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)〕、Escherichia coli JM105〔Gene, 38, 275 (1985)〕、Escherichia coli SOLRTM Strain〔ストラタジーン社より市販〕およびE. coli LE392 (モレキュラー・クローニング第2版)等が用いられる。

【0041】

cDNAライブラリーとして、例えば以下のようにして作製したcDNAライブラリーをあげることができる。

ヒト胃粘膜のpoly (A)+ RNAよりcDNA合成システム (cDNA Synthesis System, GIBCO BRL社製) を用いてcDNAを合成し、その両端にEcoRI-NotI-SalI adaptor (Super Choice System for cDNA Synthesis; GIBCO BRL社製) を付加した後、クローニングベクターλZAP II (λZAP II/EcoRI/CIAP Cloning Kit, STRATAGENE社製) のEcoRI部位に挿入し、Stratagene社 Gigapack III Gold Packaging Extractを用いてin vitro packagingを行うことにより、cDNAライブラリーを作製する。

【0042】

また、市販のcDNAライブラリーを購入して使用することもできる。

データベース検索で明らかになった候補遺伝子の塩基配列を基に、該遺伝子に特異的なプライマーを設計し、上記のようにして取得した一本鎖cDNAまたはcDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行う。増幅断片が得られた際には、該断片を適当なプラスミドにサブクローニングする。サブクローニングは、増幅DNA断片をそのまま、あるいは制限酵素やDNAポリメラーゼで処理後、常法によりベクターに組み込むことにより行うことができる。ベクターとしては、pBlue SK(-)、pBlue II SK(+) (いずれもStratagene社製)、pDIRECT [Nucleic Acid Research, 18, 6069 (1990)]、pCR-Amp SK(+) [Stratagene社製、Strategies, 5, 6264 (1992)]、pT7Blue [Novagen社製]、pCR II [インビトロジェン社製、Biotechnology, 9, 657 (1991)]、pCR-TRAP [Genhunter社製]、pNoTA_{T7} (5' → 3' 社製)などをあげることができる。

【0043】

サブクローン化されたPCR増幅断片の塩基配列を決定することにより、目的のDNA断片が取得されたか確認する。塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977)] あるいは373A・DNAシーケンサー [Perkin Elmer社製] 等の塩基配列分析装置を用いて決定することができる。

【0044】

上記で作製したcDNAライブラリーに対して、該DNA断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションまたはブランクハイブリダイゼーション（モレキュラー・クローニング 第2版）を行うことにより、 β 3Gal-T1とアミノ酸レベルで相同性を有する蛋白質をコードする可能性のあるcDNAを取得することができる。プローブとしては、該DNA断片をアイソトープあるいはジゴキシゲニン（digoxigenin）標識したものを使用することができる。

【0045】

上記の方法により取得されたDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後、モレキュラー・クローニング第2版等に記載の常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー（Sanger）らのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)〕あるいは373A・DNAシーケンサー〔パーキン・エルマー（Perkin Elmer）社製〕等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

【0046】

該方法により取得されるDNAとして、例えば、配列番号1、2、3または4で表されるポリペプチドをコードするDNA等をあげることができ、具体的には、配列番号5、6、7または8で表される塩基配列を有するDNA等をあげることができる。配列番号5のDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pAMo-G3、pBS-G3をあげることができる。配列番号6のDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pAMo-G4、pBS-G4をあげることができる。配列番号7のDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pAMo-G4-2、pBS-G4-2をあげることができる。配列番号8のDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pAMo-G7、pT7B-G7をあげることができる。

【0047】

また、上記方法で取得したDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを選択することにより、配列番号1、2、3または4記載のアミノ酸配列と比較して、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする目的のDNAを取得することができる

。例えば、他種（マウス、ラット、ウシ、サルなど）由来のcDNAライブラリーに対してスクリーニングを行うことにより、目的のDNAを取得することができる。

【0048】

該ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとは、上記で取得したDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0Mの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/l塩化ナトリウム、15mmol/lクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、上記で取得したDNAと少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0049】

該1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする目的のDNAの取得は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)（以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより行うことができる。欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、公知のポリペプチドとならない範囲に限定され、1個から数十個、特に1個から数個のアミノ酸であることが好ましい。また、本発明のポリペプチドが β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するためには、例えば配列番号1記載のアミノ酸配列と少なくとも60%以上、通常は80%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい。

【0050】

決定された新規糖転移酵素ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて、該ポリペプチドをコードするDNAを化学合成することによっても目的のDNAを調製することができる。DNAを化学合成は、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392等を用いて行うことができる。

また、後述のオリゴヌクレオチドをセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用い、これらDNAに相補的なmRNAを発現している細胞のmRNAから調製したcDNAを鋳型として、PCRを行うことによっても、目的とするDNAを調製することができる。

【0051】

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、モレキュラー・クローニング第2版等に記載の常法により、あるいは該DNAの塩基配列情報よりDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

【0052】

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号5、6、7または8で表

される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度 (T_m) および塩基数が極端に変わることはない上記記載のオリゴヌクレオチドが好ましい。具体的には配列番号9から20等に表示された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをあげることができる。

【0053】

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3' - P5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2' - O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

【0054】

(2) 取得DNAのコードするポリペプチドの活性測定

上記のようにして取得したDNAを発現ベクターに組み込んで発現プラスミドを構築する。該プラスミドを適当な動物細胞に導入後、各種の糖鎖（ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖、シアリルルイス a 糖鎖、シアリルルイス c 糖鎖）に

特異的に結合する抗体やレクチンを用いたフルオレッセンス・アクティベーター・セル・ソーター (Fluorescence Activated Cell Sorter; 以下、FACSと略記する) 解析により、該DNAが該糖鎖の合成に関与するかどうかを調べることができる。

【0055】

該発現ベクターとしては、該cDNAを組み込んで動物細胞で発現できるベクターであればいかなるものでも用いることができ、例えば、pcDNA1/Amp、pcDNA1、pCDM8 (いずれもフナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pREP4 (インビトロジェン社製)、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pAMO、pAMO A [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMO PRSA (特開平05-336963)]、pAS3-3 (特開平2-227075) 等を用いることができる。

【0056】

cDNAを組み込んだ発現ベクターを、目的とするcDNAを選択可能な動物細胞に導入し、形質転換細胞を取得する。

該発現ベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等の方法をあげることができる。

【0057】

動物細胞としては、ヒトの細胞であるNamalwa細胞、Namalwa細胞のサブラインであるNamalwa KJM-1細胞、293細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) をあげることができ、好ましくは、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞をあげることができる。

【0058】

得られた形質転換細胞を常法により培養する。

具体的には、以下の形質転換体の培養方法をあげることができる。

該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、通常pH 6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0059】

該培養により得られた形質転換細胞を、各種の糖鎖（ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖、シアリルルイスa糖鎖、シアリルルイスc糖鎖）に特異的に結合する抗体やレクチンを用いて蛍光染色した後、FACSを用いて解析する。コントロールプラスミドを導入した形質転換細胞と比較して、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖量が増加していれば、該DNAのコードする新規ポリペプチドは、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に関与する β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有していると考えることができる。一方、シアリルルイスa糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖量が増加していれば、該DNAのコードする新規ポリペプチドは、シアリルルイスa糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖の合成に関与する β 1,3-ガラクトース転移酵素活性を有していると考えることができる。

【0060】

ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識する抗体やレクチンとしては、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識するものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識する抗体としては抗i抗体、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識するレクチンとしてはpokeweed mitogen (PWMと略す)、Lycopersicon esculentum (tomato) agglutinin (LEAと略す)、Datura stramonium agglutinin (DSAと略

す)を用いることができる [J. Biol. Chem., 282, 8179-8189 (1987)、J. Biol. Chem., 259, 6253-6260 (1984)、J. Biol. Chem., 262, 1602-1607 (1987)、Carbohydr. Res., 120, 187-195 (1983)、Carbohydr. Res., 120, 283-292 (1983)、Glycoconjugate J. 7, 323-334(1990)]。

【 0 0 6 1 】

抗シアリルルイス a 糖鎖抗体または抗シアリルルイス c 糖鎖抗体としては、シアリルルイス a 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖と反応する抗体であれば、いかなるものでも用いることができ、例えば、抗シアリルルイス a 糖鎖抗体である 19-9 (Fujirebio社製)や KM231 (Kyowa Medex社製)、あるいは抗シアリルルイス c 糖鎖抗体である DU-PAN-2 (Kyowa Medex社製)をあげることができる。

【 0 0 6 2 】

また、上記形質転換細胞の細胞抽出液を用いて、公知の測定法 [J. Biol. Chem., 268, 27118 (1993)、J. Biol. Chem., 267, 2994 (1992)、J. Biol. Chem., 263, 12461 (1988)、Jpn. J. Med. Sci. Biol., 42, 77 (1989)] に準じて $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を測定することができる。コントロールプラスミドを導入した形質転換細胞に比較して、 $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が増加していれば、該 DNA のコードする新規ポリペプチドは、 $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有していると考えることができる。

また、本発明のポリペプチドの $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素活性は、公知の測定法 [J. Biol. Chem. 258, 9893-9898 (1983)、J. Biol. Chem. 262, 15649-15658 (1987)、Arch. Biochem. Biophys. 270, 630-646 (1989)、Arch. Biochem. Biophys. 274, 14-25 (1989)、特開平 06-181759、J. Biol. Chem. 273, 58-65 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 433-440 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 12770-12778 (1998)、J. Biol. Chem. 274, 12499-12507 (1999)] に準じて測定することができる。

以上のようにして、取得した新規 cDNA のコードする新規ポリペプチドの活性を明らかにすることができる。

【 0 0 6 3 】

(3) 新規 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素ポリペプチドの製造

上記の方法により得られた本発明のDNAを宿主細胞中で発現させ、本発明のポリペプチドを製造するために、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1～38等に記載された方法等を用いることができる。

【0064】

即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体ベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

【0065】

宿主細胞としては、原核細胞、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。また、動物個体や植物個体を用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、新規 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子の転写に適した位置にプロモーターを含有しているものを用いることができる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、新規 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子の発現ベクターは、原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、新規 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子、転写終結配列、より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0066】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリンガー・マンハイム社より市販)、pSE280 (インビトロジェン社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 27

7 (1989))、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBlue II SK(-) (STRATAGENE社)、pTrs30 (FERM BP-5407)、pTrs32 (FERM BP-5408)、pGHA2 (FERM BP-400)、pGKA2 (FERM B-6798)、pTerm2 (特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735)、pKK233-2 (Pharmacia社製)、pGEX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus (Invitrogen社)、pMAL-c2 (New England Biolabs社) 等を例示することができる。

【0067】

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (Ptrp)、lacプロモーター (Plac)、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター (Ptrp x 2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0068】

リボソーム結合配列としては、シャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

【0069】

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia co

li JM109, Escherichia coli HB101, Escherichia coli No.49, Escherichia coli W3110, Escherichia coli NY49, Escherichia coli BL21(DE3), Escherichia coli BL21(DE3)pLysS, Escherichia coli HMS174(DE3), Escherichia coli HMS174(DE3)pLysS, Serratia ficaria, Serratia fonticola, Serratia liquefaciens, Serratia marcescens, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Brevibacterium ammoniagenes, Brevibacterium immariophilum ATCC14068, Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066, Corynebacterium glutamicum ATCC13032, Corynebacterium glutamicum ATCC14067, Corynebacterium glutamicum ATCC13869, Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870, Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354, Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

【 0 0 7 0 】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)]、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭 63-2483942)、Gene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

【 0 0 7 1 】

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Y E p 1 3 (ATCC37115)、Y E p 2 4 (ATCC37051)、Y C p 5 0 (ATCC37419)、p H S 1 9、p H S 1 5等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、P H O 5プロモーター、P G Kプロモーター、G A Pプロモーター、A D Hプロモーター、g a l 1プロモーター、g a l 1 0プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、M F α 1プロモーター、C U P 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

【 0 0 7 2 】

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイ

ベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株をあげることができる、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwannomyces alluvius 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

【0073】

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p cDNA I/Amp、p cDNA I、p CDM8、p AGE107、p REP4、p AGE103、p AMo、p AMoA、p AS3-3等を例示することができる。

【0074】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒトCMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、モロニー・ミュリン・ロイケミア・ウイルス (Moloney Murine Leukemia Virus) のロング・ターミナル・リピート・プロモーター (Long Terminal Repeat Promoter)、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター、あるいはメタロチオネインのプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0075】

宿主細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒトの細胞であるNamalwa細胞ま

たはNamalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637（特開昭63-299）、ヒト大腸癌細胞株等をあげることができる。

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293、293等、ヒト白血病細胞としてはBALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7、ヒト大腸癌細胞株としてはHCT-15等をあげることができる。

【0076】

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。形質転換体の取得および培養は、特開平2-227075号公報あるいは特開平2-257891号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

【0077】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル〔Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)〕、モレキュラー・バイオロジー ア・ラボラトリー・マニュアル（Molecular Biology, A Laboratory Manual）、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプルメント1～38（Current Protocols in Molecular Biology）、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

【0078】

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（すべてインビトロジェン社製）等をあげることが

できる。

【0079】

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

【0080】

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞としてはSf9、Sf21 (バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル) 等、Trichoplusia niの卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4 (インビトロジェン社製) 等、カイコ卵巣由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等をあげることができる。

【0081】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

【0082】

また、動物細胞にDNAを導入する方法と同様の方法を用いて、昆虫細胞にDNAを導入することもでき、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

植物細胞または植物個体を宿主として用いる場合には、公知の方法 [組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)] に準じてポリペプチドを生産することができる。

【0083】

遺伝子発現に用いるプロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。また、プロモーターと発現させる遺伝子の間に、トウモロコシのアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン1等を挿入することにより、遺伝子の発現効率をあげることもできる。

【0084】

宿主細胞としては、ジャガイモ、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、大豆、トマト、小麦、大麦、ライ麦、アルファルファ、亜麻等の植物細胞等をあげることができる。組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であ

ればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977)、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)、特開昭60-251887]、パーテイクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2606856、特許第2517813) 等をあげることができる。

【0085】

遺伝子を導入した植物の細胞や器官は、ジャーファーマンターを用いて大量培養することができる。また、遺伝子導入した植物細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された植物個体 (トランスジェニック植物) を造成することもできる。

【0086】

動物個体を用いて本発明のポリペプチドを生産することもできる。例えば、公知の方法 [American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)] に準じて、遺伝子を導入した動物中に本発明のポリペプチドを生産することができる。

プロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである α カゼインプロモ

ーター、 β カゼインプロモーター、 β ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【0087】

本発明のポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

【0088】

即ち、動物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該組換え体DNAのコードする新規 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することにより、新規 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドを製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

【0089】

植物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該組換え体DNAのコードする新規 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することにより、新規 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドを製造することができる。

【0090】

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら生物を培養する培地は、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地で

あれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、該形質転換体が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。

【0091】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等がを用いることができる。

【0092】

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

【0093】

また培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

い。

【0094】

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【0095】

培養は、通常pH 6~8、30~40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1~7日間行う。

また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 [ファーミンジェン (Pharmingen) 社製]、Sf-900 II SFM培地 (ギブコBRL社製)、ExCell 1400、ExCell 1405 [いずれもJRHバイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製]、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

【0096】

pH 6~7、培養温度25~30℃がよく、培養時間は、通常1~5日間である。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0097】

遺伝子の発現方法としては、ポリペプチド全長を発現させる以外に、 $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する領域を含む部分ポリペプチドとして発現させることもできる。糖転移酵素は、一般にタイプII型の膜タンパク質のトポロジーを有し、N末端の数から数十アミノ酸からなる細胞質領域、疎水

性の高いアミノ酸配列を有する膜結合領域、数から数十アミノ酸からなる幹領域 (stem region)、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなっている。幹領域と触媒領域を含む残りの大半のC末端部分は、ゴルジ体内腔に露出していると考えられる。幹領域と触媒領域の境界は、N末端を欠失させたポリペプチドを作製し、どこまで欠失させると活性がなくなるかを検討することにより、実験的に求めることができる。一方、幹領域と触媒領域に関する知見のある類似の糖転移酵素とアミノ酸配列を比較することにより、幹領域と触媒領域を予想することもできる。

【0098】

本発明の新規 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素において、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、N末端の9アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く19アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも12アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなり、配列番号2および3に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、N末端の11アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く21アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも12アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなり、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、N末端の29アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く20アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも12アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると予想することができる。

【0099】

幹領域は、他の β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素や β 1,3-ガラクトース転移酵素とのアミノ酸配列上の相同性の比較、ならびに他の β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素や β 1,3-ガラクトース転移酵素の幹領域に関する知見〔本特許実施例4、特開平6-181759〕を基に推定した。したがって、配列番号1の41番目から397番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号2および3の45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド、および配列番号4の62番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

は触媒領域を含むと考えられる。

【0100】

上記のポリペプチド全長または $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する領域（触媒領域）を含む部分ポリペプチドは、直接発現させる以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌タンパク質または融合タンパク質として発現させることもできる。融合させるタンパク質としては、 β -ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖(His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、FLAGペプチド、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる〔山川彰夫，実験医学，13，469-474（1995）〕。

【0101】

本発明のポリペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

【0102】

本発明のポリペプチドが宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法〔J. Biol. Chem., 264，17619（1989）〕、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86，8227（1989）、Genes Develop., 4，1288（1990）〕、または特開平05-336963、特開平06-823021等に記載の方法を準用することにより、該ポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明のポリペプチドの活性部位を含むポリペプチドの手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

【0103】

具体的には、触媒部位を含むと考えられるアミノ酸配列を有するポリペプチドの手前に、シグナルペプチドを付加して発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができると考えられる。さらに、シグナルペプチドと触媒領域を含むポリペプチドの間、または触媒領域を含むポリペプチドのC末端に、精製・検出用のタグを付加することもできる。

精製・検出用のタグとしては、 β -ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖(His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、FLAGペプチド、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる〔山川彰夫、実験医学、13、469-474 (1995)〕。

【0104】

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

本発明ポリペプチド製造用形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離・精製するには、通常の酵素の単離・精製法を用いることができる。例えば、本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、該細胞を洗浄した後に、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。

【0105】

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製)

等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

【0106】

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。該可溶化液を、ポリペプチド変性剤を含まないあるいはポリペプチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【0107】

細胞外に該ポリペプチドが分泌される場合には、該培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。該可溶性画分から、上記無細胞抽出液上清からの単離精製法と同様の手法により、該ポリペプチドの精製標品を得ることができる。

【0108】

また、通常の糖転移酵素の精製方法〔J. Evan. Sadler ら：メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 83,458〕に準じて精製できる。

また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる〔山川彰夫，実験医学，13，469-474 (1995)〕。例えば、ロウらの方法〔Proc.Natl.Acad.Sci.,USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、特開平05-336963、特開平06-823021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフ

イーにより精製することができる。また、本発明のポリペプチドをFLAGペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗FLAG抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる〔Proc. Natl. Acad. Sci., US A, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕。

【0109】

更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

また、公知の方法〔J. Biomolecular NMR, 6, 129-134、Science, 242, 1162-1164、J. Biochem., 110, 166-168 (1991)〕に準じて、in vitro転写・翻訳系を用いて本発明の β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素を生産することができる。

【0110】

更に、本発明のポリペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（*t*-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンスド・ケムテック（Advanced ChemTech）社、パーキン・エルマー社、ファルマシアバイオテック社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント（Protein Technology Instrument）社、シンセセル・ベガ（Synthecell-Vega）社、パーセプティブ（PerSeptive）社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

【0111】

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析（平野久著、東京化学同人発行、1993年）に記載の方法により実施可能である。

本発明の新規ポリペプチドの β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性は、公知の測定法〔J. Biol. Chem., 268, 27118 (1993)、J. Biol. Chem., 267, 2994 (1992)、J. Biol. Chem., 263, 12461 (1988)、Jpn. J. Med. Sci. Biol., 42, 77 (1989)〕に準じて測定することができる。

本発明のポリペプチドの β 1,3-ガラクトース転移酵素活性は、公知の測定

法 [J. Biol. Chem. 258, 9893-9898 (1983)、J. Biol. Chem. 262, 15649-15658 (1987)、Archi. Biochem. Biophys. 270, 630-646 (1989)、Archi. Biochem. Biophys. 274, 14-25 (1989)、特開平06-181759、J. Biol. Chem. 273, 58-65 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 433-440(1998)、J. Biol. Chem. 273, 12770-12778 (1998)、J. Biol. Chem. 274, 12499-12507(1999)] に準じて測定することができる。

【0112】

(4) N-アセチルグルコサミンが β 1,3結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造

上記(3)で取得した微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞由来の形質転換体から選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中にN-アセチルグルコサミンが β 1,3結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または複合糖質を採取することにより、該糖鎖または複合糖質を製造することができる。

【0113】

N-アセチルグルコサミンが β 1,3結合でガラクトース残基に付加した構造としては、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc構造、GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc構造、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc構造、(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)_nGal β 1-4GlcNAc構造 [$n \geq 1$]、または(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)_nGal β 1-4Glc構造 [$n \geq 1$]等をあげることができる。

【0114】

培養は上記(3)に準じて行うことができる。

上記形質転換体において、本発明のポリペプチドと任意の組換え糖タンパク質(例えば医薬用組換え糖タンパク質)を、糖鎖合成可能な形質転換体中で同時に生産させることにより、該組換え糖タンパク質にN-アセチルグルコサミンが β 1,3結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖を付加することができる。

【0115】

また、上記（３）で取得した動物個体または植物個体を用い、上記（３）の方法に準じて、N-アセチルグルコサミンが β 1,3結合でガラクトース残基に付加した構造に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

【0116】

即ち、動物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、N-アセチルグルコサミンが β 1,3結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該生成物を採取することにより、N-アセチルグルコサミンが β 1,3結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

【0117】

該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

植物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、N-アセチルグルコサミンが β 1,3結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該生産物を採取することにより、N-アセチルグルコサミンが β 1,3結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

【0118】

上記（３）記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、水性媒体中で、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基またはガラクトース単糖に、N-アセチルグルコサミンが β 1,3結合で付与された反応産物を、以下の方法で製造することができる。

【0119】

即ち、ガラクトース単糖、ガラクトース残基を非還元末端に有するオリゴ糖、またはガラクトース残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質を受容基質として、上記（３）記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い

、該受容基質、該酵素源およびUDP-GlcNAcを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のガラクトースまたはガラクトース残基に $\beta 1,3$ 結合でN-アセチルグルコサミンが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することにより、該反応産物を製造することができる。

【0120】

酵素源は、ラクト-N-ネオテトラオース (lacto-N-neotetraose, Gal $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-3$ Gal $\beta 1-4$ Glc) を基質として、37℃で1分間に1 μ モルのGlcNAc $\beta 1-3$ Gal $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-3$ Gal $\beta 1-4$ Glcを生成することのできる活性を1単位 (U) として、0.1mU/l \sim 10,000U/lであり、好ましくは1mU/l \sim 1,000U/lの濃度で用いる。

【0121】

水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などをあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。また、上記(2)記載の培養により得られた形質転換体の培養液、上記(2)記載の非ヒトトランスジェニック動物より得られたミルクを水性媒体として用いることもできる。水性媒体に、必要に応じて界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。

【0122】

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン (例えばナイミンS-215、日本油脂社製) などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド (例えばカチオンF2-40E、日本油脂社製) などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・サルコシネートなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン (例えば三級アミンFB、日本油脂社製) などの三級アミン類など、N-アセチルグルコサミンが $\beta 1,3$ 結合でガラクトース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質の生成を促進するものであればいずれでもよ

く、1種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常0.1～50g/lの濃度で用いられる。

【0123】

有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどが挙げられ、通常0.1～50ml/lの濃度で用いられる。

UDP-GlcNAcとしては、市販品の他、微生物等の活性を利用して生成した反応液あるいは該反応液から精製したものをを用いることができる。該UDP-GlcNAcは0.1～500mmol/lの濃度で用いることができる。

【0124】

上記において、ガラクトース残基を非還元末端に有するオリゴ糖としては、Gal β 1-4Glc、Gal β 1-4GlcNAc、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc、Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc、Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc、Gal β 1-3GlcNAc、Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc、Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc、Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc、Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4GlcNAc、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4GlcNAc、Gal β 1-3GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc、Gal β 1-3GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4GlcNAc、Gal β 1-3GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc、Gal β 1-3GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4GlcNAc、またはこれらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有するオリゴ糖などをあげることができる。ガラクトース残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質としては、上記オリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有する糖鎖を含有する複合糖質、あるいはアシアロ複合型N結合型糖鎖を含有する複合糖質などをあげることができる。

【0125】

受容基質は0.01～500mmol/lの濃度で用いることができる。

該生成反応において、必要に応じて $MnCl_2$ 等の無機塩、 β -メルカプトエタノール、ポリエチレングリコール等を添加することができる。

生成反応は水性媒体中、 $pH 5 \sim 10$ 、好ましくは $pH 6 \sim 8$ 、 $20 \sim 50^\circ C$ の条件で $1 \sim 96$ 時間行う。

上記方法により生産される糖鎖または複合糖質より、公知の酵素的手法または化学的手法により糖鎖の一部を切り出すことができる〔日本生化学会編、続生化学実験講座、第4巻、複合糖質研究法Ⅰ,Ⅱ,東京化学同人、(1986年)、谷口直之・鈴木明身・古川清・菅原和幸 監修、グリコバイオロジー実験プロトコール、秀潤社、(1996年)〕。

【0126】

(5) 本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドを用いた疾患の治療や診断等への利用

本発明のDNAは、アンチセンスRNA/DNA技術〔バイオサイエンスとインダストリー、50, 322 (1992)、化学、46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学、16, 1463 (1997)〕あるいはトリプル・ヘリックス技術〔Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)〕を用いた炎症や癌転移の抑制等の疾病の治療に用いることができる。

【0127】

また、ノーザンハイブリダイゼーション法〔Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング 第2版と略す)〕、PCR法〔PCR Protocols, Academic Press(1990)〕、Real Time PCR法〔Junko Stevens, 実験医学(増刊), 15, 46-51 (1997)〕を用いて本発明のDNAの発現量を測定することにより、炎症や癌の診断が可能である。特に、定量的PCR法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2725 (1990)〕やReal Time PCR法は定量性に優れている。

【0128】

例えば、上記(1)記載の本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を投与することにより、本発明のポリペプチドの生産を抑制することが

できる。

即ち、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を用いて、本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写の抑制、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳の抑制を行うことが可能である。

【0129】

また、本発明のDNAあるいは該DNAより調製した上記オリゴヌクレオチドを用い、ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法により、本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現量を定量することができる。

更に、本発明のDNAをプローブとして、公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコル、秀潤社（1993年）〕を用いて、該遺伝子のプロモーター領域を取得することが可能である。

【0130】

現在、多くの機能未知のヒト染色体遺伝子の配列がデータベースに登録されている。したがって、本発明のポリペプチドをコードするヒトcDNAの配列と、データベースに登録されてるヒト染色体遺伝子の配列とを比較することにより、本発明のポリペプチドをコードするヒト染色体遺伝子を同定し、その構造を明らかにできる可能性がある。cDNAの配列と一致する染色体遺伝子配列が登録されていれば、cDNAの配列と染色体遺伝子の配列を比較することにより、本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子のプロモーター領域、エクソンおよびイントロン構造を決定することができる。

【0131】

プロモーター領域としては、哺乳動物細胞において本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するすべてのプロモーター領域があげられる。例えば、ヒト白血球細胞、ヒト大腸癌細胞あるいはヒト膵臓癌細胞で、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するプロモーター領域をあげることができる。

【0132】

糖転移酵素遺伝子には多型や変異が存在することが知られている。例えば、A B O式血液型の決定に関与する糖転移酵素に関しては、遺伝子多型に基づくアミ

ノ酸配列の違いにより以下の3種の酵素が生成される。

A型抗原の合成に關与する $\alpha 1,3$ -N-アセチルガラクトサミン転移酵素、B型抗原の合成に關与する $\alpha 1,3$ -ガラクトース転移酵素、およびO(H)型糖鎖の生成に關与する活性を持たない酵素 [Nature, 345, 229-233 (1990)]。

【0133】

またルイス式血液型の決定に關与する $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素 (F u c - T I I I) の場合も、遺伝子多型に基づくアミノ酸配列の違いにより、活性が低下または消失した酵素が生成することが知られている [J. Biol. Chem. 269, 29271-29278 (1994)、Blood 82, 2915-2919 (1993)、J. Biol. Chem. 269, 20987-20994 (1994)、J. Biol. Chem. 272, 21994-21998 (1997)]。

【0134】

F u c - T I I I 遺伝子の多型は、大腸癌における癌関連糖鎖抗原であるシアリルルイス a 糖鎖の発現と密接な関係があることが知られている [Cancer Res. 56, 330-338 (1996)、Cancer Res. 58, 512-518 (1998)]。

従って、F u c - T I I I の多型を調べることにより、病気の診断や予後の予測を行うことができると考えられる。

【0135】

本発明の新規 $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素はポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成に關与することから、白血球におけるシアリルルイス x 糖鎖や、癌細胞における癌関連糖鎖 (シアリルルイス x 糖鎖、シアリルルイス a 糖鎖、シアリルルイス c 糖鎖、ダイメリック・ルイス a 糖鎖) の合成に關与すると考えられる。したがって、本遺伝子の発現量や多型を調べることにより、炎症、癌または癌転移の診断、あるいは癌の予後の予測が可能と考えられる。

【0136】

また、本遺伝子の多型と、本遺伝子が発現している臓器における疾患との関連を調べることにより、他の疾患の診断にも利用できる。

本遺伝子の多型解析は、本遺伝子の遺伝子配列情報を用いて行うことができる。具体的には、サザンブロット法、ダイレクトシーケンス法、PCR法、DNAチップ法などを用いて遺伝子多型を解析することができる [臨床検査, 42, 15

07-1517 (1998)、臨床検査, 42, 1565-1570 (1998)]。

【0137】

(6) 本発明のポリペプチドを認識する抗体の生産

(i) ポリクローナル抗体の作製

上述(3)の方法により取得したポリペプチドの全長または部分断片精製標品、あるいは本発明の蛋白質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

【0138】

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3～20週令のラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 μ gが好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) や牛チログロブリンなどのキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

【0139】

該抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法 (ELISA法) : 医学書院刊 1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] 等で確認する。

【0140】

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿 [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)]、またはDEAE-セファロースカラム、陰

イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

【0141】

(i) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産性細胞の調製

免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

【0142】

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。該脾臓をMEM培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、1, 200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液（pH 7.6）で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

【0143】

(b) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。

例えば、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髓腫細胞株P3-X63Ag 8-U1（以下、P3-U1と略す）[Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)]等を用いることができる。

【0144】

これらの細胞株は、8-アザグアニン培地[RPMI-1640培地にグルタミン(1.5 mmol/l)、2-メルカプトエタノール(5×10^{-5} M)、ジェンタマイシン(10 μ g/ml)および牛胎児血清(FCS) (CSL社製、10%)を加えた培地（以下、正常培地という）に、さらに8-アザグアニン(1

5 μ g/ml) を加えた培地] で継代するが、細胞融合の3～4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

【0145】

(c) ハイブリドーマの作製

(a) で取得した抗体産生細胞と (b) で取得した骨髓腫細胞を MEM 培地または PBS (リン酸二ナトリウム 1.83 g、リン酸一カリウム 0.21 g、食塩 7.65 g、蒸留水 1 リットル、pH 7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髓腫細胞 = 5～10：1 になるよう混合し、1,200 rpm で5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

【0146】

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2 g、MEM 2 ml およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7 ml を混合した溶液を 0.2～1 ml 添加し、更に1～2分間毎に MEM 培地 1～2 ml を数回添加する。

【0147】

添加後、MEM 培地を加えて全量が 50 ml になるように調製する。

該調製液を 900 rpm で5分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに HAT 培地 [正常培地にヒポキサンチン (10^{-4} M)、チミジン (1.5×10^{-5} M) およびアミノプテリン (4×10^{-7} M) を加えた培地] 100 ml 中に懸濁する。

【0148】

該懸濁液を 96 穴培養用プレートに 100μ l/穴ずつ分注し、5% CO_2 インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディイズ [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)] 等に述べられている 酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

【0149】

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。
 免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のポリペプチドモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

【0150】

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返シ〔1回目は、HT培地（HAT培地からアミノプテリンを除いた培地）、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドの抗ポリペプチド抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

【0151】

(d)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristan) 0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得した本発明のポリペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

【0152】

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

【0153】

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、

ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

(6) 本発明の抗体の利用

(a) 本発明の抗体を用いて、本発明のポリペプチドを検出することができる。

【0154】

具体的にはマイクロタイタープレートを用いるELISA法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法等を用いた検出法をあげることができる。

(b) 本発明の抗体を用いて、本発明のポリペプチドを発現する細胞の免疫組織染色に利用できる。

【0155】

(c) 本発明の抗体は、炎症や癌の診断に利用することができる。

(7) スクリーニング法への応用。

本発明の新規 $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素ポリペプチドは、各種細胞において、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成に関与することから、該ポリペプチドの $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を増強または阻害する化合物を用いて、細胞におけるポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成量を増加または低下させることが可能である。

【0156】

また、該ポリペプチドをコードする遺伝子の転写過程、あるいは転写産物からタンパク質への翻訳過程を促進または抑制する化合物は、該ポリペプチドの発現を制御し、細胞におけるポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成量を制御することが可能である。

【0157】

ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖上に存在するシアリルルイスx糖鎖やシアリルルイスa糖鎖は、セレクチンのリガンドとなることが知られていることから、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成量を抑制する化合物は、抗炎症や癌転移抑制に有用と考えられる。一方、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成量を増加させる化合物は、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成やポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖が付加した複合糖質の生産に有用と考えら

れる。

【0158】

該化合物は、以下（a）～（e）に示す方法により取得可能である。

（a）上記（3）で記載した方法を用いて調製した本発明の新規 $\beta 1,3-N$ -アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチド（精製物あるいは該ポリペプチドを発現する形質転換体の細胞抽出液または培養上清）を酵素として用い、被験試料の存在下、公知の方法[J. Biol. Chem., 268, 27118 (1993)、J. Biol. Chem., 267, 2994 (1992)、J. Biol. Chem., 263, 12461 (1988)、Jpn. J. Med. Sci. Biol, 42, 77 (1989)]を用いて $\beta 1,3-N$ -アセチルグルコサミン転移酵素活性を測定し、 $\beta 1,3-N$ -アセチルグルコサミン転移酵素活性を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

【0159】

（b）本発明のポリペプチドを発現する細胞または上記（3）で記載した形質転換体を、被験試料の存在下、上記（2）で記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞表面のポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の量を、該糖鎖を認識する抗体（抗i抗体、抗I抗体）やレクチン（LEA、PWM、DSA）を用いて測定し、該糖鎖量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

【0160】

上記抗体やレクチンを用いた測定法としては、例えば、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色等を用いた検出法をあげることができる。また、FACSを用いて測定することもできる。

（c）本発明のポリペプチドを発現する細胞を、被験試料の存在下、上記（2）で記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチド量を、上記（5）で記載した本発明の抗体を用いて測定し、該ポリペプチド量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

【0161】

本発明の抗体を用いた測定法としては、例えば、マイクロタイタープレート

を用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色等を用いた検出法をあげることができる。

(d) 本発明のポリペプチドを発現する細胞を、被験試料の存在下、上記(2)で記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチドをコードする遺伝子転写産物の量を、上記(4)で記載したノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法等の方法を用いて測定し、該転写産物量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

【0162】

(e) 上記(4)で取得したプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAを組み込んだプラスミドを公知の方法により作製し、上記(3)記載の動物細胞に、上記(2)および(3)に記載の方法に準じて導入し、形質転換体を取得する。該形質転換体を、被験試料の存在下、上記(2)記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中のレポーター遺伝子の発現量を、公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコール、秀潤社(1993)、Biotechniques, 20, 914 (1996)、J. Antibiotics, 49, 453 (1996)、Trends in Biochemical Sciences, 20, 448 (1995)、細胞工学, 16, 581 (1997)〕を用いて測定し、該発現量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

【0163】

レポーター遺伝子としては、例えば、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン・フルオレッセント・プロテイン(GFP)遺伝子等をあげることができる。

【0164】

(7) ノックアウト動物の作製

本発明のDNAを含むベクターを用い、目的とする動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ニワトリ、マウス等の胚性幹細胞(embryonic stem cell)において染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAを公知の相同組換えの手法〔例えば、Nature, 326, 6110, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 5

03 (1987)等] により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作成することができる〔例えば、Nature, 350, 6315, 243 (1991)]。

【0165】

このようにして作成した胚性幹細胞クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞 (blastocyst) への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を作成することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞の染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAに任意の変異を有する個体を得ることができ、さらにその個体の掛け合わせにより相同染色体の双方に変異が入った、ホモ個体 (ノックアウト動物) を得ることができる。

【0166】

このようにして動物個体において、染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの任意の位置へ変異の導入が可能である。例えば染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳領域中への塩基置換、欠失、挿入等の変異を導入することにより、その産物の活性を変化させることができる。

【0167】

またその発現制御領域への同様な変異の導入により、発現の程度、時期、組織特異性等を改変させることも可能である。さらにCre-loxP系との組合せにより、より積極的に発現時期、発現部位、発現量等を制御することも可能である。

【0168】

このような例としては脳のある特定の領域で発現されるプロモータを利用して、その領域でのみ目的遺伝子を欠失させた例 [Cell, 87, 7, 1317 (1996)] やCreを発現するアデノウィルスを用いて、目的の時期に、臓器特異的に目的遺伝子を欠失させた例 [Science, 278, 5335, (1997)] が知られている。

【0169】

従って染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAについてもこのように任意の時期や組織で発現を制御できる、または任意の挿入、欠失、置換をその翻訳領域や、発現制御領域に有する動物個体を作成することが可能である。

【0170】

このような動物は任意の時期、任意の程度または任意の部位で、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の症状を誘導することができる。

従って、本発明のノックアウト動物は、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の治療や予防において極めて有用な動物モデルとなる。特にその治療薬、予防薬、また機能性食品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用である。

【0171】

【実施例】

以下実施例を示す。遺伝子操作的手法として、特に断らない限りモレキュラー・クローニング第2版に記載された公知の方法を用いた。

【0172】

実施例1 GlcNAc β 1,3-ガラクトース転移酵素 (β 3Gal-T1) のホモログ蛋白質をコードする可能性のある候補遺伝子の検索

β 3Gal-T1 (別名WM1) はGal β 1-3GlcNAc構造の合成に関与する β 1,3-ガラクトース転移酵素である [特開平6-181759]。遺伝子データベースから、Blast [Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)]、FrameSearch法 [Compugen社製] 等のプログラムを利用して、本酵素遺伝子と相同性のある遺伝子または本酵素とアミノ酸レベルで相同性を有する蛋白質をコードする可能性のある遺伝子を検索した結果、複数のEST (expressed sequence tag) 配列を見出した。それらは配列上3種に分類されたことから、3種の候補遺伝子が存在すると考えられた。各候補遺伝子をそれぞれG3、G4、G7と命名した。

【0173】

上記3種の配列に特異的なプライマーセットを設計し、候補遺伝子断片のクローン化を試みた。プライマーセットとしては、F-3-5とR-3-5、F-4-5とR-4-5、およびF-7-5aとR-7-3aを使用した。各プライマーの配列は配列番号9～14に示した。

【0174】

実施例2 候補遺伝子G3のクローン化

(1) 候補遺伝子G3のcDNA断片のクローン化

候補遺伝子G3に特異的なプライマー (F-3-5とR-3-5: 配列は配列番号9、10に示す) を作製し、各種臓器または各種細胞から調製した一本鎖cDNA、あるいは各種cDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行い、該当する配列を有するcDNAの存在について検討した。その結果、白血球のcDNAライブラリー (Clontech社製) または胃粘膜cDNAライブラリーを鋳型とした時に約600bpのDNA断片が増幅された。具体的な方法を以下に示す。

【0175】

白血球cDNAライブラリー (ファージライブラリー: Clontech社製) を約4万種の独立クローン毎にプール分けした後、各プールのファージ (約 1×10^7 個) を鋳型としてPCRを行った。99℃で10分熱処理したファージ (約 1×10^7 個) を含む反応溶液49.5 μ l [10mmol/l Tris-HCl (pH8.3)、50mmol/l KCl、1.5mmol/l MgCl₂、0.2mmol/l dNTP、0.001% (w/v) ゼラチン、0.2 μ M 遺伝子特異的プライマー] を97℃で5分間加熱後、氷上で5分間冷却した。次いで、recombinant Taq DNA polymerase (Takara社製) を加え、94℃で1分間、65℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、30サイクルの反応を行った。

【0176】

ヒト胃粘膜cDNAライブラリーは以下のように作製した。ヒト胃粘膜のpoly (A)+ RNAよりcDNA合成システム (cDNA Synthesis System、GIBCO BRL社製) を用いてcDNAを合成し、その両端にEcoRI-NotI-SalI adaptor (Super Choice System for cDNA Synthesis; GIBCO BRL社製) を付加した後、クローニングベクター λ ZAP II (λ ZAP II/EcoRI/CIAP Cloning Kit、STRATAGENE社製) のEcoRI部位に挿入し、Stratagene社 Gigapack III Gold Packaging Extractを用いてin vitro packagingを行うことにより、cDNAライブラリーを作製した。

【0177】

該胃粘膜cDNAライブラリー (ファージライブラリー) を約5万種の独立クローン毎にプール分けした後、各プールのファージ (約 1×10^7 個) を鋳型と

してPCRを行った。方法は上記で述べた方法と同じ。

白血球cDNAライブラリーから増幅された約600bpのDNA断片をT-ベクターであるpT7Blue (Novagen社製) に組み込み、プラスミドpT7B-G3FRを造成した。pT7B-G3FRが含むcDNA断片の全塩基配列を決定した結果、該cDNA断片の配列が実施例1で見出されたEST配列の1種と一致することが確認された。塩基配列の決定には、LI-COR社のDNAシーケンサー (dNA sequencer model 4000L)、パーキンエルマー社のDNAシーケンサー377、ならびに各シーケンサー用の反応キットを使用した。

【0178】

(2) 候補遺伝子G3の完全長cDNAのクローン化

G3の完全長cDNAを取得するために、PCR DIG probe synthesis kit (Boehringer Mannheim社製) を用いて、ジゴキシゲニン標識プローブの作製を行った。1 μ gのpT7B-G3FRと各0.2 μ Mのプライマー (F-3-5とR-3-5) を含む反応溶液39 μ lを97℃で5分間加熱後、氷上で5分間冷却した。次いで、recombinant Taq DNA polymerase 1ユニット (Takara社製) を加え、94℃で1分間、65℃で1分間、72℃で1分間からなる反応を1サイクルとして、30サイクルの反応を行った。反応液の組成はキットに従った。

【0179】

上記(1)で増幅が見られた該胃粘膜cDNAライブラリーのプール (約5万独立クローン) について、ジゴキシゲニン標識プローブを用いてブランクハイブリダイゼーションを行った。

該ハイブリダイゼーションにおいて、フィルターを、2倍濃度のSSPE [1倍濃度のSSPEの組成は、180mmol/l 塩化ナトリウム、10mmol/l リン

酸二水素ナトリウム、1mmol/l エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) より

なる (pH 7.4)]、0.1% SDSよりなる緩衝液中で65℃、10分間浸漬する条件で2回、1倍濃度のSSPE、0.1% SDSからなる緩衝液中で65℃、15分間浸漬する条件で1回、0.2x SSPE、0.1% SDS

からなる緩衝液中で65℃、10分間浸漬する条件で2回洗浄した。

【0180】

該ブランクハイブリダイゼーションの結果、ハイブリダイズする1個の独立したクローンが得られた。Qiagen社製のキット (QIAGEN Lambda System) を用いて、該クローンからファージDNAを調製した。該ファージDNAをXba IとSa Iで切断し、約1.9 kbのXba I-Sa I断片を、pBlue II SK(+)のXba I-Sa I間にサブクロニングした。このようにして造成したプラスミドをpBS-G3と呼ぶ。

【0181】

(3) プラスミドpBS-G3中に挿入されているcDNAの塩基配列の決定
上記(2)で得られたpBS-G3が含むcDNAの全塩基配列を、以下の方法で決定した。

【0182】

pBlue II SK(+)中の配列に特異的なプライマー (M13 -20 PrimerおよびReverse primer) を用いて、該cDNAの5'側および3'側の配列を決定した。決定された配列に特異的な合成DNAを調製し、それをプライマーとして用い、さらに先の塩基配列を決定した。該操作を繰り返すことにより、該cDNAの全塩基配列を決定した。

【0183】

塩基配列の決定には、LI-COR社のDNAシーケンサー (dna sequence r model 4000L) と反応キット (SequitheTM EXCEL IITM Long-ReadTM DNA-sequencing kit-Lc:エア・ブラウン)、またはパーキンエルマー社のDNAシーケンサー377と反応キット (ABI PrismTM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit:Applied Biosystems社) を使用した。

【0184】

pBS-G3が含むcDNAの全塩基配列(1912bp)を配列番号5に示した。

該cDNAは、糖転移酵素に特徴的な構造を有する397アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。このポリペプチドをG3ポリペプチドと呼び、ア

ミノ酸配列を配列番号1に示す。

【0185】

該ポリペプチドはこれまでにクローン化された5種のヒト β 1,3-ガラクトース転移酵素(β 3Gal-T1、 β 3Gal-T2、 β 3Gal-T3、 β 3Gal-T4、 β 3Gal-T5)とアミノ酸レベルで19%~24%の相同性を示した〔特開平6-181759、J. Biol. Chem. 273, 58-65 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 433-440(1998)、J. Biol. Chem. 273, 12770-12778 (1998)、J. Biol. Chem. 274, 12499-12507(1999)〕。また、該ポリペプチドはこれまでにクローン化されたヒト β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(β 3GnT)とアミノ酸レベルで約15%の相同性を示し〔Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 406-411 (1999)〕、N末端の9アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く19アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも12アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると考えられた。相同性を有する上記糖転移酵素とのアミノ酸配列の比較、ならびに上記糖転移酵素の幹領域と触媒領域に関する知見〔特開平6-181759〕を基に、幹領域は少なくとも12アミノ酸からなると予想された。したがって、41番目から397番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、触媒領域を含むと考えられる。

これらの結果および後述する実施例8の結果より該ポリペプチドは新規な β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であると考えられた。

【0186】

配列番号5の塩基配列は、特許(WO98/44112)で公開された配列とほぼ一致していた。また該配列がコードするポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号1)は、特許(WO98/44112)で公開された配列と一致していた。しかし、該特許では該ポリペプチドを分泌タンパク質と予想しているが、実際はタイプII型の膜タンパク質であり明らかに間違っている。また、他のタンパク質へのホモロジーから、該ポリペプチドを骨格筋由来成長因子スーパーファミリーに属するCardiac and pancreatic proteinと予想しているが、実際の活性については何ら明らかにしていない。該特許においては、該ポリペプチドを大腸菌、昆虫細胞、動物細胞で生産させる一般的な手法について記載されているが、実際に

ポリペプチドを発現させたデータは記載されていない。該ポリペプチドが β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であることを明らかにし、糖鎖合成への有用性を示したのは今回が最初である。

【0187】

pBS-G3を含む大腸菌であるEscherichia coli MM294/pBS-G3は、平成11年4月7日付で工業技術院生命工学工業技術研究所にFERMBP-6694として寄託されている。

【0188】

実施例3 候補遺伝子G4のクローン化

(1) 候補遺伝子G4のcDNA断片のクローン化

候補遺伝子G4に特異的なプライマー(F-4-5とR-4-5: 配列は配列番号11、12に示す)を作製し、各種臓器または各種細胞から調製した一本鎖cDNA、あるいは各種cDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行い、該当する配列を有するcDNAの存在について検討した。その結果、胃粘膜cDNAライブラリーを鋳型とした時に約200bpのDNA断片が増幅された。具体的な方法は、プライマーを変更した以外は実施例1に記載した方法と同じである。

【0189】

増幅された約200bpのDNA断片をT-ベクターであるpT7Blue (Novagen社製)に組み込み、プラスミドpT7B-G4FRを造成した。pT7B-G4FRが含むcDNA断片の全塩基配列を決定した結果、該cDNA断片の配列が実施例1で見出されたEST配列の1種と一致することが確認された。塩基配列の決定には、LICOR社のDNAシーケンサー(dNA sequencer model 4000L)、パーキンエルマー社のDNAシーケンサー377、ならびに各シーケンサー用の反応キットを使用した。

【0190】

(2) 候補遺伝子G4の完全長cDNAのクローン化

G4の完全長cDNAを取得するために、PCR DIG probe synthesis kit (Boehringer Mannheim社製)を用いて、ジゴキシゲニン標識プローブの作製を行った。
。1 μ gのpT7B-G4FRと各0.2 μ Mのプライマー(F-4-5とR-4-5)を含む反応

溶液 $39\mu\text{l}$ を 97°C で5分間加熱後、氷上で5分間冷却した。次いで、recombinant Taq DNA polymerase 1 ユニット (Takara社製) を加え、 94°C で1分間、 65°C で1分間、 72°C で1分間からなる反応を1サイクルとして、30サイクルの反応を行った。反応液の組成はキットに従った。

【0191】

上記(1)で増幅が見られた該胃粘膜 cDNA ライブラリーのプール (約5万独立クローン) について、ジゴキシゲニン標識プローブを用いてブランクハイブリダイゼーションを行った。

該ハイブリダイゼーションにおいて、フィルターを、2倍濃度の SSPE [1倍濃度の SSPE の組成は、 180mmol/l 塩化ナトリウム、 10mmol/l リン

酸二水素ナトリウム、 1mmol/l エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) より

なる ($\text{pH} 7.4$)]、 0.1% SDS よりなる緩衝液中で 65°C 、10分間浸漬する条件で2回、1倍濃度の SSPE、 0.1% SDS からなる緩衝液中で 65°C 、15分間浸漬する条件で1回、 $0.2\times$ SSPE、 0.1% SDS からなる緩衝液中で 65°C 、10分間浸漬する条件で2回洗浄した。

【0192】

該ブランクハイブリダイゼーションの結果、ハイブリダイズする1個の独立したクローンが得られた。Stratagene社のマニュアルに従って *in vivo* excision を行い、該クローンよりプラスミド pBS-G4-2 を回収した。

同様にヒト胎盤 cDNA ライブラリーを作製し、該ライブラリーよりプラスミド pBS-G4 を取得した。

【0193】

(3) プラスミド pBS-G4 および pBS-G4-2 中に挿入されている cDNA の塩基配列の決定

上記(2)で得られた pBS-G4 および pBS-G4-2 が含む cDNA の全塩基配列を、以下の方法で決定した。

【0194】

pBlue SK(-)中の配列に特異的なプライマー (M13 -20 PrimerおよびReverse primer) を用いて、該 cDNA の 5' 側および 3' 側の配列を決定した。決定された配列に特異的な合成 DNA を調製し、それをプライマーとして用い、さらに先の塩基配列を決定した。該操作を繰り返すことにより、該 cDNA の全塩基配列を決定した。

【0195】

塩基配列の決定には、LI-COR社のDNAシーケンサー (dna sequencer model 4000L) と反応キット (SequitheTM EXCEL IITM Long-ReadTM DNA-sequencing kit-Lc:エア・ブラウン)、またはパーキンエルマー社のDNAシーケンサー 377と反応キット (ABI PrismTM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit:Applied Biosystems社) を使用した。

pBS-G4 が含む cDNA の全塩基配列 (2205 bp) を配列番号 6 に示した。該 cDNA は、糖転移酵素に特徴的な構造を有する 372 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。このポリペプチドを G4 ポリペプチドと呼び、アミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

【0196】

pBS-G4-2 が含む cDNA の全塩基配列 (2180 bp) を配列番号 7 に示した。該 cDNA は、糖転移酵素に特徴的な構造を有する 372 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。このポリペプチドを G4-2 ポリペプチドと呼び、アミノ酸配列を配列番号 3 に示す。

【0197】

pBS-G4 が含む cDNA を G4 cDNA、pBS-G4-2 が含む cDNA を G4-2 cDNA と呼ぶ。

G4 cDNA と G4-2 cDNA とでは、5' 非翻訳領域の塩基配列が異なっていた他、複数の塩基の置換が見られた (図 1~4 参照)。翻訳領域中では、G4 cDNA の 1111 番目の塩基はアデニンであるが、G4-2 cDNA ではこれに相当する塩基はグアニンに置換していた。その結果、G4 ポリペプチドでは 328 番目のアミノ酸が His であるのに対し、G4-2 ポリペプチドでは、328 番目のアミノ酸が Arg に置換している。

【0198】

G4 cDNAとG4-2 cDNAで5' 非翻訳領域の塩基配列が異なっていることは、胎盤と胃では異なるプロモーターが働いていることを示唆している。それ以外の塩基置換は、個人差、体細胞変異あるいは逆転写酵素のエラーに由来すると推定される。下記の実施例で示すように、G4 cDNAとG4-2 cDNAのコードするタンパク質は、いずれも β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有していた。

【0199】

G4およびG4-2ポリペプチドは、これまでにクローン化された5種のヒト β 1,3-ガラクトース転移酵素(β 3Gal-T1、 β 3Gal-T2、 β 3Gal-T3、 β 3Gal-T4、 β 3Gal-T5)とアミノ酸レベルで22%~26%の相同性を示した〔特開平6-181759、J. Biol. Chem. 273, 58-65 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 433-440(1998)、J. Biol. Chem. 273, 12770-12778 (1998)、J. Biol. Chem. 274, 12499-12507(1999)〕。また、該ポリペプチドはこれまでにクローン化されたヒト β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(β 3GnT)とアミノ酸レベルで17.5%の相同性を示し〔Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 406-411 (1999)〕、N末端の11アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く21アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも12アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると考えられた。相同性を有する上記糖転移酵素とのアミノ酸配列の比較、ならびに上記糖転移酵素の幹領域と触媒領域に関する知見〔特開平6-181759〕を基に、幹領域は少なくとも12アミノ酸からなると予想された。したがって、45番目から372番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、触媒領域を含むと考えられる。

以上の結果および後述する実施例8, 9, 10および12の結果から、該ポリペプチドは新規な β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であると考えられた。

【0200】

配列番号6または7の塩基配列は、特許(WO98/44112)で公開され

た配列とほぼ一致していた。また、配列番号6のコードするポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号2）は、特許（WO98/21328）で公開された配列と一致していた。しかし、該特許では該ポリペプチドがタイプII型の膜タンパク質であると記載しているのみで、該ポリペプチドの実際の活性については何ら明らかにしていない。該ポリペプチドが β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であることを明らかにし、糖鎖合成への有用性を示したのは今回が最初である。

pBS-G4-2を含む大腸菌であるEscherichia coli MM294/pBS-G4は、平成11年4月7日付で工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6695として寄託されている。

【0201】

実施例4 候補遺伝子G7のクローン化

（1）候補遺伝子G7のcDNA断片のクローン化

候補遺伝子G7に特異的なプライマー（F-7-5aとR-7-3a：配列は配列番号13、14に示す）を作製し、各種臓器または各種細胞から調製した一本鎖cDNA、あるいは各種cDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行い、該当する配列を有するcDNAの存在について検討した。その結果、ヒト神経芽細胞腫細胞株SK-N-MC由来の一本鎖cDNAを鋳型とした時に約1.3kbのDNA断片が増幅された。具体的な方法を以下に示す。

【0202】

SK-N-MCはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（American Type Culture Collection; ATCC）より入手した。SK-N-MC細胞から常法〔チルグウィン（Chirgwin）ら：バイオケミストリー（Biochemistry），18，5294（1977）〕にしたがって全RNAを調製した。5 μ gの全RNAから、キット（SUPERSCRIPTM Preamplification System；BRL社製）を用いて一本鎖cDNAを合成した。反応は21 μ lで行い、反応後の溶液を水で50倍希釈し、使用するまで-80℃で保管した。

【0203】

上記一本鎖cDNA10 μ lを含む反応溶液40 μ l〔10mmol/l Tris-HCl（pH8.3）、50mmol/l KCl、1.5mmol/l

1 MgCl₂、0.2 mmol/l dNTP、0.001% (w/v) ゼラチン、0.2 μM 遺伝子特異的プライマー] を97℃で5分間加熱後、氷上で5分間冷却した。次いで、recombinant Taq DNA polymerase 1ユニット (Takara 社製) を加え、94℃で30秒間、60℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、30サイクルの反応を行った。

【0204】

増幅された約1.3 kbのDNA断片をT-ベクターであるpT7Blue (Novagen 社製) に組み込み、プラスミドpT7B-G7を造成した。

(2) プラスミドpT7B-G7中に挿入されているcDNAの塩基配列の決定

上記(2)で得られたpT7B-G7が含むcDNAの全塩基配列を、以下の方法で決定した。

【0205】

pT7Blue中の配列に特異的なプライマー (M13 -20 PrimerおよびReverse primer) を用いて、該cDNAの5'側および3'側の配列を決定した。決定された配列に特異的な合成DNAを調製し、それをプライマーとして用い、さらに先の塩基配列を決定した。該操作を繰り返すことにより、該cDNAの全塩基配列を決定した。

【0206】

塩基配列の決定には、LI-COR社のDNAシーケンサー (DNA sequencing model 4000L) と反応キット (SequitheTM EXCEL IITM Long-ReadTM DNA-sequencing kit-Lc:エア・ブラウン)、またはパーキンエルマー社のDNAシーケンサー 377と反応キット (ABI PrismTM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit:Applied Biosystems社) を使用した。

【0207】

pT7B-G7が含むcDNAの全塩基配列 (1296 bp) を配列番号8に示した。

該cDNAは、糖転移酵素に特徴的な構造を有する378アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。このポリペプチドをG7ポリペプチドと呼び、アミノ酸配列を配列番号4に示す。

【0208】

G7ポリペプチドはこれまでにクローン化された5種のヒト $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素($\beta 3Gal-T1$ 、 $\beta 3Gal-T2$ 、 $\beta 3Gal-T3$ 、 $\beta 3Gal-T4$ 、 $\beta 3Gal-T5$)とアミノ酸レベルで22%~25%の相同性を示した〔特開平6-181759、J. Biol. Chem. 273, 58-65 (1998)、J. Biol. Chem. 273, 433-440(1998)、J. Biol. Chem. 273, 12770-12778 (1998)、J. Biol. Chem. 274, 12499-12507(1999)〕。

【0209】

また、該ポリペプチドはこれまでにクローン化されたヒト $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素($\beta 3GnT$)とアミノ酸レベルで14.8%の相同性を示し〔Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 406-411 (1999)〕、N末端の29アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く20アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも12アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると考えられた。相同性を有する上記糖転移酵素とのアミノ酸配列の比較、ならびに上記糖転移酵素の幹領域と触媒領域に関する知見〔特開平6-181759〕を基に、幹領域は少なくとも12アミノ酸からなると予想された。したがって、62番目から378番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、触媒領域を含むと考えられる。

以上の結果および後述する実施例8の結果から、該ポリペプチドは新規な $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素であると考えられた。

【0210】

pT7B-G7を含む大腸菌であるEscherichia coli MM294/pT7B-G7は、平成11年4月7日付で工業技術院生命工学工業技術研究所にFERMBP-6696として寄託されている。

【0211】

実施例5 アミノ酸配列上の相同性解析

G3、G4-2およびG7ポリペプチドのアミノ酸配列、既知のヒト $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素($\beta 3Gal-T1$ 、 $\beta 3Gal-T2$ 、 $\beta 3Gal-T3$ 、 $\beta 3Gal-T4$ 、 $\beta 3Gal-T5$)のアミノ酸配列、ならびに既知のヒト $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素($\beta 3GnT$)のアミノ酸配列を

用いて、デンドログラムを作成した（図5参照）。デンドログラムは、CLUSTAL X Multiple Sequence Alignment Program (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) を用いて作成した。その結果、G3、G4-2およびG7ポリペプチドは、1つのサブグループを形成していることが判明した。G3ポリペプチドは、G4-2およびG7ポリペプチドとそれぞれ39.6%および44.5%の相同性を示した。G4-2ポリペプチドは、G7ポリペプチドと42.5%の相同性を示した。

【0212】

実施例6 動物細胞用発現プラスミドの造成

実施例2～4で取得したG3、G4、G4-2およびG7 cDNAがコードする各ポリペプチドを動物細胞で発現させるために、各cDNAを発現ベクターpAMo [J.Biol.Chem., 268, 22782(1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)] に組み込み、発現プラスミドの造成を行った。

【0213】

(1) G3ポリペプチドを発現させるためのプラスミドpAMo-G3の造成（図6参照）

pBS-G3を制限酵素XbaIとSalIで切断後、DNAポリメラーゼ・クレノー断片により平滑末端に変換した。その後、SfiIリンカー（配列番号15、16）を付与し、1.9kbのSfiI断片を取得した。一方、pAMoをSfiIとBamHIで切断後、8.7kbのSfiI断片を取得した。上記2断片を結合することにより、発現プラスミドpAMo-G3を造成した。

【0214】

SfiIリンカー（配列番号15、16）の合成とリン酸化は、常法にしたがって行った（特開平05-336963）。

(2) G4ポリペプチドを発現させるためのプラスミドpAMo-G4の造成（図7参照）

pBS-G4-2を制限酵素HindIIIとBstEIIで切断後、0.4kbのHindIII-BstEII断片を取得した。また、pT7B-G4secを制限酵素BstEIIとNotIで切断後、0.9kbのBstEII-

NotI断片を取得した。pT7B-G4 secは実施例9の(1)で示した方法で造成した。一方、pAMoをHindIIIとNotIで切断後、8.7 kbのHindIII-NotI断片を取得した。上記3断片を結合することにより、発現プラスミドpAMo-G4を造成した。

【0215】

(3) G4-2ポリペプチドを発現させるためのプラスミドpAMo-G4-2の造成(図8参照)

pBS-G4-2を制限酵素HindIIIとBstEIIで切断後、0.4 kbのHindIII-BstEII断片を取得した。また、pBS-G4-2を制限酵素BstEIIとNotIで切断後、1.5 kbのBstEII-NotI断片を取得した。一方、pAMoをHindIIIとNotIで切断後、8.7 kbのHindIII-NotI断片を取得した。上記3断片を結合することにより、発現プラスミドpAMo-G4-2を造成した。

【0216】

(4) G7ポリペプチドを発現させるためのプラスミドpAMo-G7の造成(図9参照)

pT7B-G7を制限酵素SmaIとHincIIで切断後、SfiIリンカー(配列番号15、16)を付与し、1.3 kbのSfiI断片を取得した。一方、pAMoをSfiIとBamHIで切断後、8.7 kbのSfiI断片を取得した。上記2断片を結合することにより、発現プラスミドpAMo-G7を造成した。

【0217】

実施例7 G3、G4、G4-2、G7の各ポリペプチドを発現するプラスミドを導入したヒト培養細胞におけるポリ-N-アセチルラクタミン糖鎖の合成

(1) 安定形質転換株の取得

コントロールプラスミド(pAMo)および実施例6で造成した各発現プラスミド(pAMo-G3、pAMo-G4、pAMo-G4-2、pAMo-G7)を、それぞれ $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように 10mmol/l トリス-HCl (pH 8.0) および 1mmol/l EDTA (エチレンジアミン4酢酸ナトリ

ウム) からの緩衝液 (以下、TE緩衝液と略記する) に溶解した後、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により Namalwa KJM-1細胞 [Cytotechnology, 1, 151 (1988)] に導入し、形質転換細胞を得た。

【0218】

1. 6×10^6 細胞あたり $4 \mu\text{g}$ のプラスミドを導入した後、8ml の RPMI 1640・ITPSG 培地 [7.5% NaHCO_3 を 1/40 量、200mmol/l L-グルタミン溶液 (GIBCO 社製) を 3%、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (GIBCO 社製、5000 units/ml ペニシリン、5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン) を 0.5%、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンサルフォニック・アシッド (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-hydroxypropane-3-sulfonic acid; HEPES) (10mmol/l)、インシュリン (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、トランスフェリン (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、ビルビン酸ナトリウム (5mmol/l)、亜セレン酸ナトリウム (125nM)、ガラクトース (1mg/ml) を添加した RPMI 1640 培地 (日水製薬社製) に懸濁し、 CO_2 インキュベーターで 37°C で 24 時間培養した。その後、G418 (ギブコ社製) を 0.5mg/ml になるように添加し、さらに 14 日間培養して安定形質転換株を取得した。該形質転換株は、0.5mg/ml の G418 を含む RPMI 1640・ITPSG 培地で継代した。

【0219】

(2) 各形質転換細胞におけるポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の発現量の測定

該形質転換細胞におけるポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の発現量は、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識する抗体やレクチンを用いた蛍光染色後、FACS を用いて解析することができる。ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識する抗体としては抗 i 抗体 (Den) を使用できる。ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識するレクチンとしては LEA、PWM、および DSA を使用できる。

【0220】

以下、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を認識するレクチン (LEA、P

WM) を用いた具体例を示す。

上記形質転換細胞 (各 5×10^6 個) を、20 mU の Clostridium perfringens のノイラミニダーゼ (neuraminidase, Sigma社製 N 2133) を含む $100 \mu\text{l}$ の PBS (8 g/l NaCl 、 0.2 g/l KCl 、 $1.15 \text{ g/l Na}_2\text{HPO}_4$ (無水)、 $0.2 \text{ g/l KH}_2\text{PO}_4$) に懸濁して、 37°C で1時間反応することにより、形質転換細胞のシアリダーゼ処理を行った

上記細胞 (約 1×10^6 個) をマイクロチューブ (1.5 ml : エッペンドルフ社製) にとり、遠心分離 ($550 \times g$ 、7分間) により細胞を集めた。

【0221】

該細胞を 0.9 ml の 0.1% のアジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝液 PBS (A-PBS: 8 g/l NaCl 、 0.2 g/l KCl 、 $1.15 \text{ g/l Na}_2\text{HPO}_4$ (無水)、 $0.2 \text{ g/l KH}_2\text{PO}_4$ 、 0.1% アジ化ナトリウム) で洗浄した後、該洗浄細胞に、A-PBS で $10 \mu\text{g/ml}$ に希釈した FITC 標識 LEA (EY laboratories社製) または A-PBS で $100 \mu\text{g/ml}$ に希釈した FITC 標識 PWM (EY laboratories社製) を $20 \mu\text{l}$ 加えて懸濁し、 4°C で1時間反応させた。

【0222】

反応後、細胞を 0.9 ml の A-PBS で1回洗浄した後、 0.6 ml の A-PBS に懸濁し、フルオレッセンス・アクティベティド・セル・ソーター (エピックス・エリート・フローサイトメーター (FACSCaliber; Becton Dickinson Immunocytometry Systems USA社製) を用いて解析を行なった。また対照実験として、レクチンの代わりに A-PBS を用いて同様の解析を行なった

pAMo-G3、pAMo-G4、pAMo-G4-2 または pAMo-G7 を導入した細胞においては、pAMo を導入した細胞に比較して、LEA への反応性が増加していた (図10)。また、pAMo-G3、pAMo-G4、pAMo-G4-2 または pAMo-G7 を導入した細胞においては、pAMo を導入した細胞に比較して、PWM への反応性が増加していた (図10)。

【0223】

これらの結果は、G3、G4、G4-2 あるいは G7 の cDNA を Namalwa KJ

M-1細胞で発現させることにより、細胞表面の糖タンパク質あるいは糖脂質の糖鎖上にポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が新たに合成されていることを意味している。

【0224】

また、G3、G4、G4-2あるいはG7のcDNAを発現させた細胞から分泌される糖タンパク質やオリゴ糖の糖鎖にも、ポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖が新たに合成されることを示している。したがって、G3、G4、G4-2あるいはG7のcDNAを発現させた細胞を宿主として有用な糖タンパク質を分泌生産することにより、分泌生産される糖タンパク質にポリ-N-アセチルラクトサミンを含有する糖鎖を付与することが可能である。

【0225】

一方、上記形質転換細胞に対して、シアリルルイス c 糖鎖に対する抗体であるDU-PAN-2を用いて蛍光染色を行った時には抗体の反応性は変化しなかった。方法は常法 [J. Biol. Chem. 274, 12499-12507(1999)] にしたがった。

【0226】

実施例8 G3、G4、G4-2またはG7ポリペプチドを発現するプラスミドを導入したヒト培養細胞における $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定

実施例7で取得した、G3、G4、G4-2またはG7ポリペプチドを発現するプラスミドを導入した安定形質転換細胞の細胞抽出液を用いて、 $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を調べた。

【0227】

上記形質転換細胞（約 2×10^7 個）をマイクロチューブ（1.5ml：エッペンドルフ社製）にとり、遠心分離（ $550 \times g$ 、7分間）により細胞を集めた。該細胞を0.9mlのPBSで洗浄した後、該洗浄細胞を 20 mmol/l HEPES（pH7.2）、1% TritonX-100からなる溶液（ $100 \mu\text{l}$ ）に懸濁し、超音波破砕機（Bioruptor；コスモ・バイオ社製）を用いて細胞を破砕した。4℃で1時間放置した後、遠心分離（ $550 \times g$ 、7分間）により上清を取得した。該上清を酵素サンプルとした。

【0228】

上記酵素サンプルを用いて、 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を測定した。

ピリジルアミノ化した糖鎖基質の調製や活性測定は、既知の方法〔特開平6-181759、特開平06-823021、J. Biol. Chem. 269, 14730-14737(1994)、J. Biol. Chem., 267, 2994 (1992)〕に準じて行った。

【0229】

具体的には、30 μ lのアッセイ溶液〔200 mmol/l MOPS (pH7.5)、50 mmol/l UDP-GlcNAc (SIGMA社)、20 mmol/l MnCl₂、0.3% TrironX-100、50 μ M ピリジルアミノ化糖鎖基質、上記細胞溶解液10 μ l〕中で37℃、16時間反応後、生産物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により検出した。

【0230】

基質としては、アミノピリジンで蛍光標識したラクト-N-ネオテトラオース (Lacto-N-neotetraose, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc; 以下、LNnTと略記する) を使用した。

LNnTはオックスフォード・グライコシステムズ社から購入した。オリゴ糖の蛍光標識は、常法〔Agric. Biol. Chem., 54, 2169 (1990)〕に従って行った。

【0231】

UDP-GlcNAc (糖供与体) を含むアッセイ溶液と含まないアッセイ溶液を用いて反応を行った後、HPLCで解析し、UDP-GlcNAcを含むアッセイ溶液でのみ出現するピークを生成物とした。

反応が終了したアッセイ溶液は、100℃で5分間処理後、10,000×gで5分間遠心して上清を取得し、その一部(5 μ l)をHPLCに供した。

【0232】

HPLCは、TSK-gel ODS-80Tsカラム(4.6×300mm; 東ソー)を使用し、溶出液として0.02M 酢酸アンモニウム緩衝液(pH4.0)を用い、溶出温度50℃、流速0.5ml/分の条件で行った。

生成物の検出は、蛍光スペクトルフォトメーターFP-920(日本分光)を

用いて行った（励起波長320nm、放射波長400nm）。

【0233】

生成物の同定は、スタンダード糖鎖と溶出時間が一致することを指標とした。スタンダード糖鎖としては、アミノピリジル化したGlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glcを使用した。

生成物の定量は、アミノピリジル化したラクトースをスタンダードとして用い、蛍光強度を比較することにより行った。

【0234】

コントロールプラスミド（pAMo）および各発現プラスミド（pAMo-G3、pAMo-G4、pAMo-G4-2、pAMo-G7）を導入した安定形質転換細胞の細胞抽出液を用いて活性測定を行った結果、生産物（GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc）に転換された基質（LNnT）の割合は、コントロールプラスミドを導入した細胞では1.8%であったのに対し、G3、G4、G4-2またはG7ポリペプチドの発現プラスミドを導入した細胞では、順に2.7%、2.8%、2.8%、2.3%に増加していた。すなわち、G3、G4、G4-2またはG7ポリペプチドの発現プラスミドを導入した細胞では、コントロールプラスミドを導入した細胞に比較して、 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が増加していることが判明した。

【0235】

以上の結果から、G3、G4、G4-2またはG7ポリペプチドは、新規な β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であることが証明された。この結果は、G3、G4、G4-2またはG7ポリペプチドを用いて、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基に、N-アセチルグルコサミンが β 1,3結合で付加した糖鎖を合成可能なことを示している。

【0236】

実施例9 Namalwa KJM-1細胞を宿主としたFLAGペプチド融合型 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素（G4）の分泌生産

（1）FLAGペプチド融合型分泌ベクターpAMoF2の造成

FLAGペプチド（配列番号17）を任意のタンパク質のN末端に付加した形

で分泌発現するための分泌ベクター pAMoF2 の造成を行った。免疫グロブリンκ のシグナル配列および FLAG ペプチドをコードする DNA は、6 種の合成 DNA を用いて作製した。

【0237】

pAMo を HindIII と Asp718 で切断することにより、約 8.7 kb の HindIII - Asp718 断片を取得した。HindIII 切断部位と Asp718 切断部位を連結するためのリンカーとして以下の 6 種の DNA [IgK-1 (配列番号 18)、IgK-2 (配列番号 19)、IgK-3 (配列番号 20)、IgK-4 (配列番号 21)、IgK-5 (配列番号 22)、IgK-6 (配列番号 23)] を合成した。なお、これらの DNA によって構築されるリンカー中には PmaCI、StuI、SnaBI の各制限酵素切断部位が組み込まれている。6 種の DNA はそれぞれアプライド・バイオシステムズ社 380A・DNA 合成機を用いて合成した。合成した DNA は、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製、以下同じ) を用いてリン酸化した後に使用した。

【0238】

上記で取得した 6 種のリン酸化合成 DNA と約 8.7 kb の HindIII - Asp718 断片を結合することにより、プラスミド pAMoF2 を構築した。

(2) プラスミド pAMoF2-i52S の造成

PCR 用のプライマーとして、配列番号 24 で示される DNA (以下、C12-7 と呼ぶ) および配列番号 25 で示される DNA (以下、C12-9 と呼ぶ) を合成した (サワディー・テクノロジーから購入することも可能)。

【0239】

C12-7 には BamHI サイトが C12-9 には NotI サイトが導入されるようにデザインされている。

PCR は、宝酒造社製のキット (GeneAmp™ DNA Amplification Reagent Kit with AmpliTaq™ Recombinant Taq DNA Polymerase) を用いて行った。反応液の調製はキットの方法に従って行い、DNA サーマルサイクラー (PERKIN ELMER CETUS DNA Thermal Cycler; 宝酒造社販売) を用いて、94℃-30秒、65℃-1分、72℃-2分の反応を 10 サイクル行った後、さらに 72℃で 7

分間反応させた。鋳型としてはプラスミド pAMo-i [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 14294-14299 (1997)] を 10 ng 使用した。該 PCR により、約 1.1 kb の DNA 断片を取得した。

【0240】

約 1.1 kb の PCR 増幅 DNA 断と T-ベクター pT7Blue (Novagen 社製) を結合することにより、プラスミド pT7B-i52S No. 3 を構築した。

次いでプラスミド pAMoF2-i52S の造成を行った。

【0241】

pAMoF2 を StuI と BanIII で切断し、約 7.2 kb の StuI-BanIII 断片を取得した。pAMo を BanIII と NotI で切断し、約 1.7 kb の BanIII-NotI 断片を取得した。pT7B-i52S No. 3 を BamHI で切断後、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I・クレノー断片を用いて BamHI 消化によって生じた 5' 突出末端を平滑末端に変え、引き続き NotI で切断することにより、約 1.1 kb の BamHI (平滑末端)-NotI 断片を取得した。

【0242】

上記で得た、約 7.2 kb の StuI-BanIII 断片、約 1.7 kb の BanIII-NotI 断片および約 1.1 kb の BamHI (平滑末端)-NotI 断片を結合し、プラスミド pAMoF2-i52S を構築した。

(3) FLAG ペプチド融合型 G4 ポリペプチドの分泌発現用プラスミド pAMoF2-G4 の造成 (図 11 参照)

クローン化した $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G4) は、その一次配列から、N 末端の 11 アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く 21 アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも 12 アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半の C 末端部分からなると考えられた。

【0243】

そこで、G4 ポリペプチドの N 末端の 11 アミノ酸からなる細胞質領域、21 アミノ酸からなる膜結合領域、および幹領域の一部 (5 アミノ酸) を除去し、該除

去領域に免疫グロブリンのシグナル配列ならびにFLAGペプチドを付加することによりG4ポリペプチドの分泌発現を試みた。

【0244】

まず、G4ポリペプチドの触媒活性を有すると考えられる領域〔配列番号2の38番目のグルタミン酸から372番目のチロシンまで〕をコードするDNA領域をPCRを用いて調製し、T-ベクターであるpT7Blue (Novagen社製) に組み込むことにより、プラスミドpT7B-G4secを造成した。以下具体的方法を記す。

【0245】

PCR用のプライマーとして、G4-SFとG4-SR (各配列を配列番号26、27に示す) を合成した (サワディー・テクノロジーから購入することも可能)。

PCRは、宝酒造社製のキット (GeneAmp™ DNA Amplification Reagent Kit with AmpliTaq™ Recombinant Taq DNA Polymerase) を用いて行った。反応液の調製はキットの方法に従って行い、DNAサーマルサイクラー (PERKIN ELMER CETUS DNA Thermal Cycler; 宝酒造社販売) を用いて、94℃-30秒、65℃-1分、72℃-2分の反応を10サイクル行った後、さらに72℃で7分間反応させた。鋳型としては、実施例3で造成したプラスミドpBS-G4を20ng使用した。

【0246】

該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、約1.0kbのDNA断片を回収した。該DNA断片をT-ベクターpT7Blue (Novagen社製) に組み込むことにより、pT7B-G4sec (No. 13) を造成した。

【0247】

pT7B-G4sec (No. 13) 中に組み込まれたDNA断片の塩基配列を決定し、PCRによるエラーがないことを確認した。

G4-SFにはBamHIサイトがG4-SRにはNotIサイトが導入されるようにデザインされているため、pT7B-G4sec (No. 13) を制限酵素BamHIとNotIで切断することにより、PCR増幅断片部分を切り出すことができる。pT7B-G4sec (No. 13) を制限酵素BamHIとNotIで

切断することにより、G4ポリペプチドの触媒活性を有すると考えられる領域〔配列番号2の38番目のグルタミン酸から372番目のチロシンまで〕をコードする1.0kbのBamHI-NotI断片を取得した。一方、プラスミドpAMoF2-i52Sを制限酵素BamHIとNotIで切断することにより、8.9kbのBamHI-NotI断片を取得した。上記2断片を結合することにより、pAMoF2-G4を造成した(図11)。

【0248】

(2) FLAGペプチド融合型G4ポリペプチドのNamalwa KJM-1細胞での分泌生産

コントロールプラスミドpAMoF2および上記で造成したG4ポリペプチドのFLAGペプチド融合型分泌発現プラスミドpAMoF2-G4をキアジェン (Qiagen)社製のプラスミド調製キット (／plasmid／maxi kit; 商標番号41031)を用いて調製した。

【0249】

調製取得したプラスミドはエタノール沈殿の後、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようにTE緩衝液に溶解した。

実施例7に記載した方法を用いて、各プラスミドをそれぞれNamalwa KJM-1細胞に導入し、安定形質転換体を取得した。

【0250】

取得した形質転換体を、G418を $0.5\text{mg}/\text{ml}$ 、牛胎児血清を2%含むRPMI1640培地30mlに 5×10^4 細胞/mlになるように懸濁し、CO₂インキュベーターで37℃、10日間培養した。

培養後、 $160\times g$ 、10分間および $1500\times g$ 、10分間の条件で遠心分離することにより細胞を除き、上清を回収した。

【0251】

該培養上清は、 -80°C で保存することが可能で、使用時に解凍して用いることができる。

プラスミドpAMoF2-G4のコードする $\beta 1,3\text{-N}$ -アセチルグルコサミン転移酵素は、FLAGペプチドとの融合タンパク質として分泌発現されることに

なるため、抗FLAG M1アフィニティーゲル (Anti-FLAG M1 Affinity Gel; コスモ・バイオ社) を用いて、容易に精製が可能である。

【0252】

上記で取得した培養上清にアジ化ナトリウム、塩化ナトリウム、および塩化カルシウムを、それぞれ最終濃度0.1%、150 mmol/l、および2 mmol/lになるように添加した後、抗FLAG M1アフィニティーゲル (Anti-FLAG M1 Affinity Gel; コスモ・バイオ社) を30 μ l 添加し、4℃で一晩ゆっくり攪拌した。

【0253】

攪拌後、160×gで10分間、遠心分離することにより抗FLAG M1アフィニティーゲルを回収し、該ゲルを50 mmol/l トリス-塩酸 (pH 7.4)、150 mmol/l 塩化ナトリウム、1 mmol/l 塩化カルシウムを含む緩衝液1 mlで2回洗浄した。

【0254】

洗浄後、該ゲルに50 mmol/l トリス-塩酸 (pH 7.4)、150 mmol/l 塩化ナトリウム、2 mmol/l EDTAを含む緩衝液30 μ l を添加し、4℃で30分間処理することにより、ゲルに吸着したタンパク質を溶出した。その後、160×gで10分間遠心分離することにより上清を取得した。該ゲルに再度50 mmol/l トリス-塩酸 (pH 7.4)、150 mmol/l 塩化ナトリウム、2 mmol/l EDTAを含む緩衝液30 μ l を添加し、4℃で10分間処理した後、160×gで10分間遠心分離することにより上清を取得した。その後、上記の操作を再度行い、合計3回溶出操作を行った。

【0255】

該溶出液には、最終濃度が4 mmol/lになるように1 M 塩化カルシウムを添加した。

(3) FLAGペプチド融合型G4ポリペプチドの β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定

上記(2)で調製した溶出液15 μ lを用いて、Namalwa KJM-1細胞で分泌発現させたFLAGペプチド融合型G4ポリペプチドの β 1,3-N-アセチルグルコ

サミン転移酵素活性の測定を行った。活性測定は実施例8の方法を用いた。その結果、pAMoF2-G4を導入したNamalwa KJM-1細胞の培養上清由来の溶出液を使用した際には、 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が検出された。生産物へ転換された基質の割合は0.51%であった。一方、ベクターであるpAMoF2を導入したNamalwa KJM-1細胞の培養上清由来の溶出液を使用した際には、活性は全く検出されなかった。

【0256】

以上の結果より、Namalwa KJM-1細胞で分泌発現させたFLAGペプチド融合型G4ポリペプチドは β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有することが示された。この結果は、 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G4)をFLAGペプチドとの融合タンパク質として動物細胞で分泌生産可能なこと、また生産された融合タンパク質は抗FLAG M1アフィニティーゲルを用いて容易に精製可能であることを示している。また、生産した融合タンパク質を用いて糖鎖合成が可能なことを示している。

【0257】

実施例10 昆虫細胞を宿主としたFLAGペプチド融合型 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G4)の分泌生産

実施例8で示したFLAGペプチド融合型G4ポリペプチドの昆虫細胞での分泌発現を行った。

【0258】

(1) FLAGペプチド融合型G4ポリペプチドを昆虫細胞で分泌発現するための組換えウィルスの作製

目的タンパク質をコードするDNAをトランスファーベクターと呼ばれる特殊なプラスミドに組み込む工程(工程1)と、工程1で作製した目的DNAを組み込んだトランスファーベクターと野生型ウィルスとを昆虫細胞にコトランスフェクションし、相同組み換えにより組換えウィルスを取得する工程(工程2)の2工程で、組換えウィルスを作製した。該工程は、ファーマーミンジェン社製バキュロゴールドスターターキット(製品番号PM-21001K)を用い、該キットのマニュアルに従い以下の手順で行った。

【0259】

(工程1)FLAGペプチド融合分泌型G4ポリペプチドをコードするDNAのトランスファーベクターへの組み込み(図12)

トランスファーベクターpVL1393(ファーマンジェン社製)のBamHIサイトとNotIサイトの間に、実施例9で示したFLAGペプチド融合分泌型G4ポリペプチドをコードするDNAを組み込んだプラスミドpVL1393-F2G4の造成を行った。

【0260】

実施例9で作製したpAMOF2-G4を制限酵素HindIIIとNotIで切断し、1.05kbのHindIII-NotI断片を得た。

pVL1393由来を制限酵素BamHIとBstPIで切断し、3.2kbのBamHI-BstPI断片を得た。

【0261】

pVL1393由来を制限酵素NotIとBstPIで切断し、6.4kbのNotI-BstPI断片を得た。

BamHIサイトとHindIIIサイトを連結するためのリンカーとして配列番号28、29に示すDNAを合成し、T4 polynucleotide kinaseを用いて5'末端のリン酸化を行った。

【0262】

上記3断片とリンカーを結合することにより、pVL1393-F2G4を造成した(図12)。

(工程2)組換えウィルスの作製

TNM-FHインセクトメディウム(ファーマンジェン社製)を用いて培養した昆虫細胞Sf9(ファーマンジェン社製)に、線状バキュロウイルスDNA(バキュロゴールド・バキュロウイルスDNA(BaculoGold baculovirus DNA)、ファーマンジェン社製)および上記プラスミドpVL1393-F2G4をリポフェクチン法[蛋白質核酸酵素、37, 2701(1992)]により導入することにより、以下のようにして組換えバキュロウイルスを作製した。

【0263】

1~5 μ gのpVL1393-F2G4および15 ngの線状バキュロウィルスDNAを12 μ lの蒸留水に溶解後、リポフェクチン(GIBCO BRL社製)6 μ l (6 μ g)と蒸留水6 μ lとを混和したものを添加し、室温で15分間放置した。

【0264】

約 2×10^6 個のSf9細胞を2 mlのSf900-II培地(GIBCO BRL社製)に懸濁し、直径35 mmの細胞培養用プラスチックシャーレに入れた後、pVL1393-F2G4、線状バキュロウィルスDNA、およびリポフェクチンの混和溶液全量を添加し、27℃で3日間培養した。

【0265】

該培養液より、組換えウィルスを含む培養上清1 mlを採取した。

該培養上清を取得したシャーレには、TNM-FHインセクトメディウムを新たに1 ml加え、更に27℃で4日間培養した。培養後、同様にして組換えウィルスを含む培養上清を更に1.5 ml取得した。

【0266】

(2) 組み換えウィルス溶液の取得

約 8×10^6 個のSf9細胞を5 mlのEX-CELL400培地(JRH社製)に懸濁し、25 cm²フラスコ(グライナー社製)に入れ、室温で30分放置して細胞をフラスコに付着させた後、上清を除き、該フラスコに1 mlのEX-CELL400培地と上記(1)で取得した組換えウィルスを含む培養上清1 mlを添加した。

【0267】

添加後、室温で1時間緩やかに振とうすることにより、細胞とウィルスを十分に接触させた後、TNM-FHインセクトメディウムを4 ml加え、27℃で4日間培養した。

該培養液を1500×gで10分間遠心分離することにより、組換えウィルスの感染したSf9細胞および組換えウィルス溶液5.5 mlを得た。

【0268】

約 2×10^7 個のSf9細胞を15 mlのEX-CELL400培地に懸濁し、

75 cm²フラスコ（グライナー社製）に入れ、室温で30分放置して細胞をフラスコに付着させた後、上清を除き、該フラスコに5 mlのEX-CELL 400培地と上記で取得した組み換えウイルス溶液1 mlを添加した。

【0269】

添加後、室温で1時間緩やかに振とうすることにより、細胞とウイルスを十分に接触させた後、TNM-FHインセクトメEDIUMを10 ml加え、27℃で4日間培養した。該培養液を1500×gで10分間遠心分離することにより、換えウイルスが感染したSf9細胞および組み換えウイルス溶液15 mlを得た。

【0270】

該組み換えウイルス溶液のウイルスの力価は以下の方法で算定することができる【ファーマンジェン社製バキュロゴールドスターキット・マニュアル】。

約 6×10^6 個のSf9細胞を4 mlのEX-CELL 400培地に懸濁し、直径60 mmの細胞培養用プラスチックシャーレに入れ、室温で30分間放置して細胞をシャーレに付着させた後、上清を除き、該シャーレにEX-CELL 400培地400 μ lおよびEX-CELL 400培地で 10^{-4} または 10^{-5} に希釈した上記組み換えウイルス溶液100 μ lを添加する。

【0271】

添加後、該シャーレを室温で1時間緩やかに振とうすることにより、細胞とウイルスを十分に接触させる。

接触後、シャーレより培地を除去し、該シャーレに、2%低融点アガロース【アガーブラーク・アガロース（Agarplaque Agarose）；ファーマンジェン社製】を含む2 mlのEX-CELL 400培地（42℃に保温）と、2 mlのTNM-FHインセクトメEDIUM（42℃に保温）の混合液を流し込み、室温で15分間放置する。

【0272】

放置後、乾燥を防ぐために該シャーレにビニルテープをまき、密閉可能なプラスチック製容器に該シャーレを入れ、27℃で5日間培養する。

培養後、該シャーレに0.01%ニュートラルレッドを含むPBS緩衝液1 ml

1を加え、更に1日培養した後、出現したプラークの数を数える。

【0273】

(3) FLAGペプチド融合型G4ポリペプチドの分泌生産と精製

プラスミドpVL1393-F2G4由来の組換えウイルスのコードするG4ポリペプチドは、FLAGペプチドとの融合タンパク質として分泌発現されることになるため、抗FLAG M1アフィニティーゲル (Anti-FLAG M1 Affinity Gel; コスモ・バイオ社) を用いて、容易に精製が可能である。

【0274】

約 2×10^7 個のSf21細胞を15mlのEX-CELL400培地に懸濁し、 75 cm^2 フラスコ (グライナー社製) に入れ、室温で30分放置して細胞をフラスコに付着させた後、上清を除き、該フラスコに4mlのEX-CELL400培地と上記(2)で取得した組換えウイルス溶液1mlを添加した。

【0275】

添加後、室温で1時間緩やかに振とうすることにより、細胞とウイルスを十分に接触させた後、TNM-FHインセクトメディウムを10ml加え、27℃で4日間培養した。該培養液を $1500 \times g$ で10分間遠心分離することにより、分泌型G4を含むと思われる培養上清を15mlを得た。

【0276】

上記で取得した培養上清30mlにアジ化ナトリウム、塩化ナトリウム、および塩化カルシウムを、それぞれ最終濃度0.1%、 150 mmol/l 、および 2 mmol/l になるように添加した後、抗FLAG M1アフィニティーゲル (Anti-FLAG M1 Affinity Gel; コスモ・バイオ社) を $30 \mu\text{l}$ 添加し、4℃で一晩ゆっくり攪拌した。

【0277】

攪拌後、 $160 \times g$ で10分間、遠心分離することにより抗FLAG M1アフィニティーゲルを回収し、該ゲルを 50 mmol/l トリス-塩酸 (pH7.4)、 150 mmol/l 塩化ナトリウム、 1 mmol/l 塩化カルシウムを含む緩衝液1mlで2回洗浄した。

【0278】

洗浄後、該ゲルに50mmol/l トリス-塩酸 (pH7.4)、150mmol/l 塩化ナトリウム、2mmol/l EDTAを含む緩衝液80 μ lを添加し、4℃で30分間処理することにより、ゲルに吸着したタンパク質を溶出した。その後、160 \times gで10分間遠心分離することにより上清を取得した。該ゲルに再度50mmol/l トリス-塩酸 (pH7.4)、150mmol/l 塩化ナトリウム、2mmol/l EDTAを含む緩衝液80 μ lを添加し、4℃で10分間処理した後、160 \times gで10分間遠心分離することにより上清を取得した。その後、上記の操作を再度行い、合計3回溶出操作を行った。

【0279】

該溶出液には、最終濃度が4mmol/lになるように1M 塩化カルシウムを添加した。

このようにして調製した溶出液の15 μ lを用いてSDS-PAGEを行った後、クーマジ・ブリリアント・ブルーを用いて染色を行った(図13)。

【0280】

pVL1393-F2G4由来の組換えウイルスを感染させたSf21の培養上清から調製した溶出液を使用した際には、43~48kDのブロードなバンドが確認された。一方、ベクターであるpVL1393由来の組換えウイルスを感染させたSf21の培養上清から調製した溶出液を使用した際には、該バンドは検出されなかった。

【0281】

以上の結果より、FLAGペプチド融合型G4ポリペプチドが培養上清中に分泌生産され、抗FLAG M1アフィニティーゲルを用いて容易に精製可能であることが示された。

(4) FLAGペプチド融合型G4ポリペプチドの β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定

上記(3)で調製した溶出液15 μ lを用いて、昆虫細胞で分泌生産させたFLAGペプチド融合型G4ポリペプチドの β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定を行った。活性測定は実施例8の方法を用いた。その結果、pVL1393-F2G4を導入した昆虫細胞の培養上清由来の溶出液を使用した際

には、 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が検出された。生産物へ転換された基質の割合は、12.1%であった。

【0282】

溶出前のレジンを用いた場合も β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素が検出された。生産物へ転換された基質の割合は、21.0%であった。この結果は、レジンに酵素を吸着した状態でも、糖鎖合成が可能なことを示している。

一方、ベクターであるpVL1393を導入した昆虫細胞の培養上清由来の溶出液を使用した際には活性は検出されなかった。

【0283】

以上の結果より、昆虫細胞で分泌発現させたFLAGペプチド融合型G4ポリペプチドは β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有することが示された。この結果は、 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G4)をFLAGペプチドとの融合タンパク質として昆虫細胞で分泌生産可能なこと、また生産された融合タンパク質は抗FLAG M1アフィニティーゲルを用いて容易に精製可能であることを示している。また、生産した融合タンパク質を用いて糖鎖合成が可能なことを示している。

Namalwa KJM-1細胞で生産させた場合に比較して、昆虫細胞で生産させた場合は、生産量が高いことが明らかになった。

【0284】

実施例11 分泌型 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(分泌型G4)の基質特異性の検討

実施例10で分泌生産したFLAGペプチド融合型G4ポリペプチドを用いて、 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G4)の基質特異性の検討を行った。

【0285】

(1) アミノピリジル化オリゴ糖を基質とした解析

活性測定法は、実施例8で示した方法を用いた。具体的には、30 μ lのアッセイ溶液[200 mmol/l MOPS (pH7.5)、20 mmol/l UDP-GlcNAc (SIGMA社)、20 mmol/l MnCl₂、50 μ M ピリジルアミノ化糖鎖基質、上記溶出液15 μ l] 中で37℃

、14.5時間反応後、生産物をHPLCにより検出した。基質としては、ラクトーN-ネオテトラオース (Lacto-N-neotetraose, $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$; 以下LNnTと略記する)、ラクトーN-テトラオース (Lacto-N-tetraose, $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$; 以下LNTと略記する)、ラクトーN-フコペンタオースII (Lacto-N-fucopentaose II, $\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$;

以下LNFP-IIと略記する)、ラクトーN-フコペンタオースIII (Lacto-N-fucopentaose III, $\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$; 以下LNFP-IIIと略記する)、ラクトーN-フコペンタオースV (Lacto-N-fucopentaose V, $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{Glc}$; 以下LNFP-Vと略記する)、およびラクトーN-ダイフコヘキサオースII (Lacto-N-difucohexaose II, $\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{Glc}$; 以下LNDFH-IIと略記する) [いずれもオックスフォード・グライコシステムズ社製] を、アミノピリジンで蛍光標識したものを使用した。基質の蛍光標識は、常法 [Agric. Biol. Chem., 54, 2169 (1990)] に従って行った。

【0286】

それぞれの基質について、UDP-GlcNAc (糖供与体) を含むアッセイ溶液と含まないアッセイ溶液を用いて反応後、HPLCで解析しUDP-GlcNAcを含むアッセイ溶液でのみ出現するピークを生成物とした。

反応が終了したアッセイ溶液は、100℃で5分間処理後、10,000×gで5分間遠心して上清を取得し、その一部 (5 μ l) をHPLCに供した。

【0287】

HPLCは、TSK-gel ODS-80Tsカラム (4.6×300mm; 東ソー) を使用し、溶出液として0.02M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0) を用い、溶出温度50℃、流速0.5ml/分の条件で行った。

生成物の検出・定量は、~~蛍光スペクトルフォトメーターFP-920 (日本分~~ 光) を用いて行った (励起波長320nm、放射波長400nm)。

【0288】

LNnTを基質とした時の活性を100%とした時の相対活性を第1表に示した。

LNnTを基質とした時の基質の生産物への転換効率は12.9%であった。 $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素(G4)は、LNnTに加えて、LNTやLNFP-Vも良い基質とすることが判明した。既知の $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素は、LNnTは良い基質とするが、LNTはほとんど基質としないことが知られている[J. Biol. Chem., 268, 27118 (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 406-411 (1999)]。したがって、 $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素(G4)は、既知の $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素とは明らかに基質特異性が異なる酵素であることが判明した。

【0289】

大腸癌組織や大腸癌細胞株においては、dimeric Lewis a糖鎖抗原[Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc]を有する癌関連糖鎖が発現することが知られており、例えばGal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Glc-Cerという構造を有する糖脂質が存在することが明らかになっている[J. Biol. Chem., 266, 8439-8446 (1991)]。 $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素(G4)は、Gal β 1-3GlcNAc構造の末端のガラクトース残基にも効率よくN-アセチルグルコサミンを転移できることから、上記dimeric Lewis a糖鎖の骨格糖鎖の合成には、既知の $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素ではなく、 $\beta 1, 3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素(G4)が関与していると考えられる。下記の実施例13の(3)で詳細に述べるが、G4転写物は、大腸癌細胞株で高発現している。

【0290】

【表1】

第1表

アミノピリジル化オリゴ糖を基質とした β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G4) の基質特異性

基質名	糖鎖構造	相対活性 (%)
LNT	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	100
LNFP-III	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	4.7
LNT	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	84.5
LNFP-II	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	0
LNFP-V	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc	65.1
LNDFH-II	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc	0

(2) 無標識オリゴ糖を基質とした解析

糖転移酵素反応は以下のようにして行った。40 μ l のアッセイ溶液 [50 mmol/l MOPS (pH7.5)、5 mmol/l UDP-GlcNAc (SIGMA社)、5 mmol/l MnCl₂、10 mmol/l 糖鎖基質、上記溶出液10 μ l] 中で37℃、16時間反応した。次いで、100℃で5分間処理後、10,000×gで20分間遠心して上清を取得し、その一部をHPAE/PAD (High Performance Anion Pulsed Amperometric Detection; DIONEX社) を用いて解析した。具体的方法は常法 [Anal. Biochem., 189, 151-162 (1990)、J. Biol. Chem. 273, 433-440(1998)] に準じて行った。

【0291】

基質としては、以下の無標識のオリゴ糖を用いた：ラクトース (Lactose, Gal β 1-4Glc)、N-アセチルラクトサミン (N-Acetylactosamine, Gal β 1-4GlcNAc; 以下LacNAcと略記することがある)、LNT、ラクト-N-ネオヘキサース (Lacto-N-neohexaose, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc; 以下LNTと略記する)。

【0292】

それぞれの基質について、UDP-GlcNAc (糖供与体) を含むアッセイ溶液と含まないアッセイ溶液を用いて反応後、HPAE/PADを用いて解析、UDP-GlcNAcを含むアッセイ溶液でのみ出現するピークを生成物とした。生成物の同定は、スタンダード糖鎖と溶出時間が一致することを指標とした。

スタンダード糖鎖としては、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glcを使用した。

【0293】

LNnTを基質とした時の活性を100%とした時の相対活性を第2表に示した。LNnTを基質とした時の基質の生産物への転換効率は1.7%であった。 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G4)は、LNnTに加えて、LNT、LNnHやGal β 1-4Glcも良い基質とすることが判明した。一方、Gal β 1-4GlcNAcは基質としなかった。既知の β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は、Gal β 1-4GlcもGal β 1-4GlcNAcも良い基質とされている[J. Biol. Chem., 268, 27118 (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 406-411 (1999)]。したがって、 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G4)は、既知の酵素とは明らかに基質特異性が異なる酵素であることが判明した。

【0294】

【表2】

第2表

無標識オリゴ糖を基質とした β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G4)の基質特異性

基質名	糖鎖構造	相対活性 (%)
LNnT	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	100
LNT	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	114
LNnH	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	45
Lactose	Gal β 1-4Glc	235
LacNAc	Gal β 1-4GlcNAc	0

一方、GlcNAcおよびGlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glcを受容基質として、分泌型G4の β 1,3-ガラクトース転移酵素活性を測定した結果、活性は検出されなかった。糖転移酵素反応は以下のようにして行った。40 μ lのアッセイ溶液 [50 mmol/l

MOPS

(pH7.5)、5 mmol/l UDP-Gal (SIGMA社)、5 mmol/l MnCl₂、10 mmol/l 糖鎖基質、上記溶出液10 μ l] 中で37℃、16時間反応した。次いで、100℃で5分間処理後、10,000 \times gで20分間遠心して上清を取得し、その一部をH

P A E / P A D (High Performance Anion Pulsed Amperometric Detection ; D IONEX社) を用いて解析した。具体的方法は常法 [Anal. Biochem., 189, 151-162 (1990)、J. Biol. Chem. 273, 433-440(1998)] に準じて行った。

【0295】

実施例12 分泌型 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(分泌型G4)を用いたポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成

実施例10で分泌生産したFLAGペプチド融合型G4ポリペプチドと β 1,4-ガラクトース転移酵素を用いて、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成を行った。

【0296】

(1) 2段階反応

LNnT (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) に実施例10で分泌生産したFLAGペプチド融合型G4ポリペプチドを作用させることにより、LNnTの非還元末端のガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンが β 1,3結合で付加した糖鎖 (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) を合成した。次いで、該糖鎖にウシミルクより精製した β 1,4-ガラクトース転移酵素 (Sigma社製) を作用させることにより、該糖鎖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基にガラクトースが β 1,4結合で付加した糖鎖 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) を合成した。同様にして、LNT (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) を基質として、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glcを合成した。また、LNFP-V [Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc] を基質として、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glcを合成した。

【0297】

具体的な反応は以下のように行った。

30 μ lの反応溶液 [200 mmol/l MOPS (pH7.5)、20 mmol/l UDP-GlcNAc (SIGMA社)、20 mmol/l MnCl₂、50 μ M ピリジルアミノ化糖鎖基質、上記溶出液15 μ l] 中で37℃、14.5時間反応した。基質としては、LNnT、LNTまたはLNFP-Vを使用した。実施例11記載の方法と同様にして、生産物の生成をHPLCにより確認後、 β 1,4-ガラクトース転移酵素 (20 mU) とUDP-Gal (20

mmol/l) を添加し、37℃、14.5時間反応した。生産物の生成はHPLCにより確認した。

【0298】

(2) one-pot反応

LNnT (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) に実施例10で分泌生産したFLA Gペプチド融合型G4ポリペプチドとウシミルクより精製した β 1,4-ガラクトース転移酵素 (Sigma社製) を同時に作用させることにより、該糖鎖の非還元末端にN-アセチルラクトサミンが付加した糖鎖 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) を合成した。同様に、LNT (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) を基質として、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc を合成した。また、LNFP-V [Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc] を基質として、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc を合成した。

【0299】

具体的な反応は以下のように行った。

30 μ lの反応溶液 [200 mmol/l MOPS (pH7.5)、20 mmol/l UDP-GlcNAc (SIGMA社)、20 mmol/l UDP-Gal (SIGMA社)、20 mmol/l MnCl₂、50 μ M ピリジルアミノ化糖鎖基質、上記溶出液10 μ l、 β 1,4-ガラクトース転移酵素20 mU] 中で37℃、14.5時間反応した。基質としては、LNnT、LNTまたはLNFP-Vを使用した。生産物の生成はHPLCにより確認した。

【0300】

実施例13 G3、G4、G7の各遺伝子の転写産物の各種細胞における発現量の検討

G3、G4 (G4-2)、G7の各遺伝子の転写産物の定量は、常法 [PCR Protocols, Academic Press(1990)] にしたがって半定量的PCR法により行った。

また、どの細胞でも同程度発現していると考えられる β -アクチンの転写産物の定量も同時に行い、細胞間でのmRNA量の違いや、サンプル間での逆転写酵素によるmRNAから一本鎖cDNAへの変換効率に大差ないことを確認した。

β -アクトチン転写産物の定量は、常法〔ギリランド (Gilliland) ら：プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc.Natl. Acad.Sci.), USA, 87, 2725 (1990)、J. Biol. Chem., 269, 14730(1994)、特開平06-181759〕にしたがって定量的PCR法により行った。

【0301】

(1) 各種細胞および細胞株由来の一本鎖cDNAの合成

細胞株としては、大腸癌細胞株 (WiDR, Colo205, SW1116, LS180, DLD-1)、肺癌細胞株 (QG90, HLC-1, PC9)、膵臓癌細胞株 (Capan-1, Capan-2)、前立腺癌細胞株PC-3、胃癌細胞株KATOIII、T細胞株 (Jurkat, CCRF-CEM, HSB-2, PEER、Molt-3、Molt-4, HUT78, HPB-ALL)、B細胞株 (Namalwa KJM-1, Daudi, Wa, CCRF-SB, Jiyoye, RPMI1788, RPMI8226, H0328-8, BALL-1, KOPN-K, IM-9)、メラノーマ細胞株WM266-4、顆粒球/単球系細胞株 (THP-1, HL-60, U-937)、神経芽細胞腫細胞株SK-N-MCを用いた。QG90、HPB-ALL、Wa、SW1116およびJurkatは愛知癌センターより入手した。HLC-1は大阪大学癌研究所より入手した。H0328-8は九州大学農学部食糧化学より入手した。KOPN-Kは埼玉中央病院より入手した。KATO IIIおよびPC-9は免疫生物研究所より入手した。CCRF-SB、RPMI8226は大日本製薬より入手した。BALL-1、PEER、Molt-4、Daudi、IM-9、KY821はJCRBより入手できる。それ以外の細胞は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) より入手できる。

【0302】

phytohemagglutinin-P (PHA-P) および12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)で刺激したJurkat細胞の調製は以下のようにして行った。10% FCSを含むRPMI 1640培地を用いて、 4×10^5 細胞/mlでシードしたJurkat細胞に、 $1 \mu\text{g/ml}$ のPHA-Pおよび 50 ng/ml のTPAを添加し、3時間、12時間、または24時間培養後、細胞を回収した。

【0303】

また、健康な成人の末梢血よりナイコメッド・ファーマ (Nycomed Pharma) 社製のキットであるPolymorphprepTMを用いて多形核白血球と単核球を分離取得した。取得した単核球は常法〔ゴナワ (Gonawa) ら：ジャーナル・オブ・イムノロジー

ー (J. Immunol.), 130, 706 (1983)] にしたがってさらに単球およびリンパ球に分離して取得した。

【0304】

各細胞の全RNAは常法〔チルグウィン (Chirgwin) ら: バイオケミストリー (Biochemistry), 18, 5294 (1977)] にしたがって調製した。全RNAから一本鎖cDNAの合成はキット (SUPERTM Preamplification System; BRL社製) を用いて行った。細胞株については5 μ gの全RNAから、血球細胞については、1 μ gの全RNAから一本鎖cDNAを合成し、それぞれ水で50倍および10倍希釈してPCRの鋳型として使用した。プライマーとしては、オリゴ(dT)プライマーまたはランダムプライマーを用いた。SK-N-MC、SK-N-SH、Colo205、SW1116、LS180、DLD-1、Capan-1、Capan-2に関しては、ランダムプライマーを使用した。それ以外はオリゴ(dT)プライマーを使用した。

【0305】

また、ヒト各種臓器由来のmRNA (Clontech社製) から同様にして一本鎖cDNAを合成した。1 μ gのmRNAから一本鎖cDNAを合成し、水で240倍希釈してPCRの鋳型として使用した。プライマーとしては、オリゴ(dT)プライマーを用いた。mRNAとしては、以下の35種の臓器由来のmRNAを使用した。1副腎、2脳、3尾状核、4海馬、5黒質、6視床、7腎、8脾臓、9脳下垂体、10小腸、11骨髄、12扁桃腺、13小脳、14脳梁、15胎児脳、16胎児腎、17胎児肝臓、18胎児肺、19心臓、20肝臓、21肺、22リンパ節、23乳腺、24胎盤、25前立腺、26唾液腺、27骨格筋、28脊髄、29脾臓、30胃、31精巣、32胸腺、33甲状腺、34気管、35子宮。

【0306】

(2) 定量的PCR用のスタンダードおよび内部コントロールの調製

pBS-G3、pBS-G4-2、pT7B-G7をcDNA部分を切り出す制限酵素で切断して直鎖状DNAに変換した後、定量用のスタンダードとして用いた。各プラスミドが完全に切断された事を確認後、酵母のトランスファースRNAを1 μ g/mlで含む水で段階的に希釈して使用した。

【0307】

また、pUC119-ACTおよびpUC119-ACTdをcDNA部分を切り出す制限酵素で切断して直鎖状DNAに変換した後、それぞれ β -アクチンの転写産物定量用のスタンダードおよび内部コントロールとして用いた〔J. Biol. Chem., 269, 14730(1994)、特開平06-181759〕。各プラスミドが完全に切断された事を確認後、酵母のトランスファーRNAを $1\mu\text{g}/\text{ml}$ で含む水で段階的に希釈して使用した。

【0308】

(3) PCR法を用いたG3、G4、G7の各遺伝子の転写産物の定量

(1)で調製した各種細胞および細胞株由来の一本鎖cDNAを鋳型としてPCRを行った。PCR用のプライマーとしてはG3転写物検出用にはF-3-5とR-3-5を、G4転写物検出用にはF-4-5とR-4-5を、G7転写物検出用にはF-7-3a(配列を配列番号30に示す)とR-7-3aを使用した。また、上記(2)で作製したスタンダードを鋳型として同様にPCRを行うことにより検量線を作製した。

【0309】

PCR反応は、ニッポンジーン社製のRecombinant Taq DNA Polymerase (Gene Taq)と添付の $10\times$ Gene Taq Universal Bufferおよび 2.5mmol/l dNTP Mixtureを用いて、説明書に従って行った。反応は $20\mu\text{l}$ で行い、その際、ジメチルスルホキシド(dimethyl sulfoxide)を最終濃度が5%になるように加えた。

【0310】

Taq DNA ポリメラーゼ以外を加えた反応液($19\mu\text{l}$)をMJ RESEARCH社のサーマル・サイクラー(DNA Engine PTC-200 Peltier Thermal Cyclor)を用いて、 97°C で3分間処理した後、氷中で急冷した。次いで、該反応液に5分の1に希釈したTaq DNA ポリメラーゼを $1\mu\text{l}$ を加えた後、MJ RESEARCH社のサーマル・サイクラーを用いて、 94°C で30秒間、 60°C で1分間、 72°C で2分間の反応を26~30サイクル行った。該反応液の一部($7\mu\text{l}$)をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルをSYBR Green I nucleic acid stain (Molecular Probes社)で染色した。増幅されたDNA断片のパターンをフルオロイメージャー(FluorImager SI; Molecular Dynamics社製)で解析することにより、増幅され

たDNA断片の量を測定した。より正確な転写産物の定量を行なうため、PCRのサイクル数を変えて同様のPCRを行った。スタンダードの量はPCRのサイクル数に応じて変化させた。

【0311】

β -アクチンの転写産物の定量については既報 [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、特開平06-181759] と同様に行った。

G3転写産物は、発現量は少ないながら調べた35種全てのヒト臓器で発現していた(図14)。また、ヒトの各種血球細胞株、ならびにヒト抹消血から調製した多型核白血球、単球、リンパ球においても発現がみられた(図15)。

【0312】

G4転写産物は、(1)に示した35種のヒト臓器の中では、気管、胎盤および胃のみで少量発現していた(図16)。ヒトの各種血球細胞株、ならびにヒト抹消血から調製した多型核白血球およびリンパ球においては発現がみられなかった(図17)。

【0313】

一方、大腸癌細胞株(WiDR、Colo205、SW1116、LS180、DLD-1)、肺癌細胞株(QG90、HLC-1、PC9)、膵臓癌細胞株(Capan-1、Capan-2)、および胃癌細胞株KATOIIIにおいては、比較的多量の発現がみられた(図18)。一例として、以下に定量結果を示す。WiDR、QG90、PC-3、HLC-1、PC9、KATOIII、SK-N-MC、SK-N-SH、Colo205、SW1116、LS180、DLD-1、Capan-1、Capan-2におけるG4転写物の発現量を、 β -アクチン転写物の発現量に対する割合(%)で示した値は、順に0.49、0.29、0.069、0.34、0.35、0.94、0.027、0.0037、0.10、4.6、0.95、0.85、0.67、0.92である。

【0314】

G7転写産物は、(1)に示した35種のヒト臓器の中では、脳、尾状核、海馬、腎、扁桃体、小脳、および胎児脳で少量発現していた(図19)。ヒト抹消血から調製した多型核白血球、単球およびリンパ球においてはほとんど発現がみられなかった(図20)。T細胞株においてはJurkatとHPB-ALLでのみ少量の発現が見られ、B細胞株においては発現は見られなかった(図20)。

【0315】

一方、神経芽細胞腫細胞株SK-N-MCおよび前立腺癌細胞株PC-3においては比較的多量の発現がみられた。大腸癌細胞株 (Colo205、SW1116、LS180)、膵臓癌細胞株 (Capan-1、Capan-2) においては少量の発現が見られた。

以上の結果から、G3、G4、G7の各遺伝子の発現分布は異なることが明らかになった。したがって、G3、G4、G7の3種の遺伝子は、いずれも β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素をコードしているが、各遺伝子は異なる組織で異なる機能を担っていると考えられる。

【0316】

白血球においては、G3転写物の発現量が多いことから、白血球におけるポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成にはG3が関与していることが示唆された。したがって、G3転写物やG3ポリペプチドの発現量を調べることにより、炎症の診断ができる可能性がある。また、G3遺伝子の発現を抑制したり、G3ポリペプチドの活性を阻害することにより炎症を抑制できる可能性もある。

また、乳腺においてはG3転写物が発現していることから、人乳中に含まれるラクト-N-ネオテトラオース ($\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-3\text{Gal } \beta 1-3\text{Glc}$) やラクト-N-テトラオース ($\text{Gal } \beta 1-3\text{GlcNAc } \beta 1-3\text{Gal } \beta 1-3\text{Glc}$) などの $\text{GlcNAc } \beta 1-3\text{Gal}$ 構造を有するオリゴ糖の合成には、G3が関与している可能性がある。

【0317】

G4転写物に関しては、大腸癌、膵臓癌、胃癌由来の細胞株で発現量が増加していることから、G4転写物やG4ポリペプチドの発現量を調べることにより、癌の診断ができる可能性がある。また、G4遺伝子の発現を抑制したり、G4ポリペプチドの活性を阻害することにより、癌細胞の転移を抑制できる可能性もある。

【0318】

G7転写物に関しても、神経芽細胞腫、前立腺癌、大腸癌、膵臓癌由来の細胞株で発現量が増加していることから、G7転写物やG7ポリペプチドの発現量を調べることにより、癌の診断ができる可能性がある。また、G7遺伝子の発現を抑制したり、G7ポリペプチドの活性を阻害することにより、癌細胞の転移を抑

制できる可能性もある。

【0319】

また、これまでにクローン化された2種の β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の各種細胞や組織における発現分布は、今回取得した3種の新規 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G3、G4、G7)とは異なることから、今回取得した3種の新規 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は、既知の酵素とは異なる機能を有していると考えられる。

【0320】

実施例14 昆虫細胞を宿主としたFLAGペプチド融合型 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G3)の分泌生産

実施例10と同様にして、FLAGペプチド融合型G3ポリペプチドの昆虫細胞での分泌発現を行った。

【0321】

(1) プラスミドpVL1393-F2G3の造成

G3ポリペプチドは、その一次配列から、N末端の9アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く19アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも12アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると考えられた。そこで、G3ポリペプチドのN末端の9アミノ酸からなる細胞質領域、19アミノ酸からなる膜結合領域、および幹領域の一部(2アミノ酸)を除去し、該除去領域に免疫グロブリンのシグナル配列ならびにFLAGペプチドを付加することによりG3ポリペプチドの分泌発現を試みた。

【0322】

まず、G3ポリペプチドの触媒活性を有すると考えられる領域〔配列番号1の31番目のセリンから397番目のシステインまで〕をコードするDNA領域をPCRを用いて調製し、pCR-Bluntベクター(Invitrogen社製)に組み込むことにより、~~プラスミドpBlunt-G3を造成した。~~以下具体的方法を記す。

【0323】

PCR用のプライマーとして、配列番号31で示されるDNA(以下、G3-

1と呼ぶ) および配列番号32で示されるDNA (以下、G3-2と呼ぶ) を合成した。G3-1にはBamHIサイトがG3-2にはNotIサイトが導入されるようにデザインされている。

PCR反応は宝酒造社製Pyrobest DNA Polymeraseと添付の10×Pyrobest Bufferおよび2.5mmol/l dNTP Mixtureを用いて、説明書に従って行った。DNAサーマルサイクラー (PERKIN ELMER CETUS DNA Thermal Cycler; 宝酒造社製) を用いて、94℃-30秒、65℃-1分、72℃-2分の反応を16サイクル行った後、さらに72℃で10分間反応させた。鋳型としては実施例2で造成したプラスミドpBS-G3を20ng使用した。該PCRにより、約1.1kbのDNA断片を取得した。該DNA断片をpCR-B1untベクターに組み込むことにより、プラスミドpB1unt-G3を造成した。pB1unt-G3中に組み込まれたDNA断片の塩基配列を決定し、PCRによるエラーがないことを確認した。

【0324】

pB1unt-G3を制限酵素BamHIとNotIで切断することにより、G3ポリペプチドの触媒活性を有すると考えられる領域〔配列番号1の31番目のセリンから397番目のシステインまで〕をコードする1.1kbのBamHI-NotI断片を取得した。pVL1393を制限酵素NotIとBstPIで切断し、6.4kbのNotI-BstPI断片を取得した。実施例10で造成したpVL1393-F2G4を制限酵素BamHIとBstPIで切断し、3.3kbのBamHI-BstPI断片を取得した。上記3断片を結合することにより、pVL1393-F2G3を造成した。

【0325】

(2) 組換えウィルスの作製

FLAGペプチド融合型G3ポリペプチドを昆虫細胞で分泌発現させるための組換えウィルスの作製を行った。昆虫細胞Sf9に、線状バキュロウイルスDNAと上記(1)で造成したプラスミドpVL1393-F2G3をリポフェクション法により導入することにより、組換えバキュロウイルスを作製した。方法は、実施例10に記載の方法を用いた。

(3) FLAGペプチド融合型G3ポリペプチドの分泌生産と精製

上記(2)で作製した組換えウイルスを用いて、FLAGペプチド融合型G3ポリペプチドを昆虫細胞で分泌生産させた。次いで、該ポリペプチドを含有する培養上清から該ポリペプチドを精製した。方法は、実施例10に記載の方法を用いた。

精製サンプルの15 μ lを用いてSDS-PAGEを行った後、クーマジ・ブリリアント・ブルーを用いて染色を行った(図21)。pVL1393-F2G3由来の組換えウイルスを感染させたSF21の培養上清から精製したサンプルを使用した際には、51~56 kDのバンドが確認された。各バンドの分子量の違いは付加する糖鎖の数や大きさの違いに由来すると考えられる。G3ポリペプチドには、N結合型糖鎖の付加が可能な部位が5箇所存在している。一方、ベクターであるpVL1393由来の組換えウイルスを感染させたSF21の培養上清から同様に精製したサンプルを使用した際には、該バンドは検出されなかった。

【0326】

以上の結果より、FLAGペプチド融合型G3ポリペプチドが昆虫細胞の培養上清中に分泌生産され、抗FLAG M1アフィニティーゲルを用いて容易に精製可能であることが示された。

(4) FLAGペプチド融合型G3ポリペプチドの β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定

上記(3)で調製した精製サンプル15 μ lを用いて、FLAGペプチド融合型G3ポリペプチドの β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定を行った。活性測定は実施例8の方法を用いた。その結果、 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が検出された。生産物へ転換された基質の割合は、100%であった。一方、ベクターであるpVL1393由来の組換えウイルスを感染させたSF21の培養上清から同様に精製したサンプルを使用した際には、活性は検出されなかった。

【0327】

以上の結果より、昆虫細胞で分泌発現させたFLAGペプチド融合型G3ポリ

ペプチドは $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有することが示された。この結果は、 $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G3) を FLAG ペプチドとの融合タンパク質として昆虫細胞で分泌生産可能であり、また、生産した融合タンパク質を用いて糖鎖合成が可能なことを示している。

【0328】

実施例15 分泌型 $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素 (分泌型G3) の基質特異性の検討

実施例14で精製したFLAGペプチド融合型G3ポリペプチドを用いて、 $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G3) の基質特異性の検討を行った。

【0329】

(1) ピリジルアミノ化オリゴ糖を基質とした解析

実施例11の(1)で示した方法を用いて、FLAGペプチド融合型G3ポリペプチドの基質特異性の検討を行った。酵素反応は37℃で2時間行った。

ピリジルアミノ化LNnTを基質とした時の活性を100%とした時の相対活性を第3表に示した。LNnTを基質とした時の基質の生産物への転換効率は82.5%であった。 $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G3) は、LNnTは良い基質とするが、LNTはほとんど基質としないことが判明した。一方、LNT中のグルコース残基にフコースが $\alpha 1,3$ 結合で付加したオリゴ糖であるLNFP-Vは、G3の比較的よい基質となることが明らかとなった。LNnT中の非還元末端から2番目に存在するGlcNAc残基にフコースが $\alpha 1,3$ 結合で付加したオリゴ糖であるLNFP-IIIは、G3の基質にならないことも明らかになった。また、LNT中の非還元末端から2番目に存在するGlcNAc残基にフコースが $\alpha 1,4$ 結合で付加したオリゴ糖であるLNFP-IIやLNDFH-IIは、G3の基質にならないことも明らかになった。

【0330】

第1表、第3表および後述の第5表を比較することにより、 $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G3) は、本発明で取得した他の $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G4、G7) とは明らかに基質特異性が異なる酵素であることも判明した。

【0331】

【表 3】

第 3 表

ピリジルアミノ化オリゴ糖を基質とした β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 3) の基質特異性

基質名	糖鎖構造	相対活性 (%)
LNnT	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	100
LNFP-III	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	0
LNT	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	3.7
LNFP-II	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	0
LNFP-V	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc	30.8
LNDFH-II	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc	0

【0332】

(2) 無標識オリゴ糖を基質とした解析

実施例 11 の (2) で示した方法を用いて、FLAG ペプチド融合型 G 3 ポリペプチドの基質特異性の検討を行った。酵素反応は 37℃ で 2 時間行った。

LNnT を基質とした時の活性を 100% とした時の相対活性を第 4 表に示した。LNnT を基質とした時の基質の生産物への転換効率率は 4.6% であった。 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 3) は、4 糖の LNnT に加えて、2 糖の Lactose、および 6 糖の LNnH も良い基質とすることが判明した。以上のことから、G 3 はポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖を効率よく合成できると考えられる。LNnT、Lactose、LNnH に対する活性と比較すると活性は低い、G 3 は LacNAc および LNT も基質とした。既知の β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素は、Lactose よりも LacNAc を良い基質とすることが知られている [J. Biol. Chem., 268, 27118 (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96, 406-411 (1999)]。したがって、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 3) は、既知の酵素とは明らかに基質特異性が異なる酵素であることが判明した。一例として、クローン化された β 3 GnT の基質特異性 (文献値) を第 4 表に合わせて示す [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96, 406-411 (1999)]。

第 2 表、第 4 表および後述の第 6 表との比較からも、実施例 14 の結果同様、

β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 3) は、本発明で取得した他の

β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G4、G7) とは明らかに基質特異性が異なる酵素であることも確認された。

【0333】

【表4】

第4表

無標識オリゴ糖を基質とした β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G3) の基質特異性

基質名	糖鎖構造	相対活性 (%)	
		G3	β 3GnT
LNT	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	100	100
LNT	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	27	6
LNT	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	132	
Lactose	Gal β 1-4Glc	128	67.1
LacNAc	Gal β 1-4GlcNAc	21	95.5

一方、GlcNAcおよびGlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glcを受容基質として、分泌型G3の β 1,3-ガラクトース転移酵素活性を測定した際には、活性は検出されなかった。したがって、G3は β 1,3-ガラクトース転移酵素活性は有していないことが明らかになった。方法は実施例11の(2)に記載の方法を用いた。

【0334】

実施例16 分泌型 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (分泌型G3) を用いたポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成

実施例14で精製したFLAGペプチド融合型G3ポリペプチドと β 1,4-ガラクトース転移酵素を用いて、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成を行った。

【0335】

(1) one-pot反応

実施例12の(2)で示した方法を用いて、

LNTに、実施例14で精製したFLAGペプチド融合型G3ポリペプチドとウシミルクより精製した β 1,4-ガラクトース転移酵素 (Sigma社製) を同時に作用させることにより、LNTの非還元末端に、N-アセチラクトサミンが付加した糖

鎖 ($\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Glc}$)、およびLNnTの非還元末端にポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖 ($\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-3}$)_n ($n \geq 2$) が付加した糖鎖を合成した。

【0336】

具体的な反応は以下のように行った。

30 μl の反応溶液 [200 mmol/l MOPS (pH7.5)、20 mmol/l UDP-GlcNAc (SIGMA社製)、50 mmol/l UDP-Gal (SIGMA社製)、20 mmol/l MnCl_2 、50 $\mu\text{mol/l}$ ピリジルアミノ化糖鎖基質、実施例14で精製したG3ポリペプチド10 μl 、 $\beta 1,4$ -ガラクトース転移酵素20 mU] 中で37℃、5時間反応した。基質としては、ピリジルアミノ化したLNnTを使用し、生産物の生成はHPLCにより確認した。方法は、実施例11の(1)で示した方法に従った。

その結果、ピリジルアミノ化したLNnTの非還元末端に ($\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-3}$)_n ($n = 1, 2, 3$ または 4) が付加した糖鎖が合成された。したがって、G3ポリペプチドと $\beta 1,4$ -ガラクトース転移酵素を用いたone-pot反応により、効率よくポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を合成可能なことが明らかとなった。酵素量、基質量、反応時間を増加させることにより、さらに長いポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖の合成も可能と考えられる。

【0337】

実施例17 昆虫細胞を宿主としたFLAGペプチド融合型 $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素(G7)の分泌生産

実施例10と同様にして、FLAGペプチド融合型G7ポリペプチドの昆虫細胞での分泌発現を行った。

(1) プラスミドpVL1393-F2G7の造成

ポリペプチドG7は、その一次配列から、N末端の29アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く20アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも12アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると考えられた。そこで、G7ポリペプチドのN末端の29アミノ酸からなる細胞質領域、20アミノ酸からなる膜結合領域、および幹領域の一部(6アミノ酸)を除去し、該除去領域に免疫グロブリンのシグナル配列ならびにFLAG

ペプチドを付加することによりG7ポリペプチドの分泌発現を試みた。

【0338】

まず、G7ポリペプチドの触媒活性を有すると考えられる領域〔配列番号4の56番目のアラニンから378番目のアルギニンまで〕をコードするDNA領域をPCRを用いて調製し、pCR-B1untベクターに組み込むことにより、プラスミドpB1unt-G7を造成した。以下具体的方法を記す。

PCR用のプライマーとして、配列番号33で示されるDNA（以下、G7S-1と呼ぶ）および配列番号34で示されるDNA（以下、G7S-2と呼ぶ）を合成した。

【0339】

G7S-1にはBglIIサイトがG7S-2にはNotIサイトが導入されるようにデザインされている。

PCR反応は宝酒造社製Pyrobest DNA Polymeraseと添付の10×Pyrobest Bufferおよび2.5mmol/l dNTP Mixtureを用いて、説明書に従って行った。DNAサーマルサイクラー（PERKIN ELMER CETUS DNA Thermal Cycler；宝酒造社販売）を用いて、94℃-30秒、65℃-1分、72℃-2分の反応を16サイクル行った後、さらに72℃で10分間反応させた。鋳型としては実施例4で造成したプラスミドpT7B-G7を20ng使用した。該PCRにより、約1.0kbのDNA断片を取得した。該DNA断片をpCR-B1untベクターに組み込むことにより、プラスミドpB1unt-G7を造成した。pB1unt-G7中に組み込まれたDNA断片の塩基配列を決定し、PCRによるエラーがないことを確認した。

【0340】

pB1unt-G7を制限酵素BglIIとNotIで切断することにより、G7ポリペプチドの触媒活性を有すると考えられる領域〔配列番号4の56番目のアラニンから378番目のアルギニンまで〕をコードする1.0kbのBglII-NotI断片を取得した。pVL1393を制限酵素NotIとBstPIで切断し、6.4kbのNotI-BstPI断片を取得した。実施例10で造成したpVL1393-F2G4を制限酵素BamHIとBstPIで切断し

た、3.3 kbのBamHI-BstPI断片を取得した。上記3断片を結合することにより、pVL1393-F2G7を造成した。

【0341】

(2) 組換えウィルスの作製

FLAGペプチド融合型G7ポリペプチドを昆虫細胞で分泌発現させるための組換えウィルスの作製を行った。昆虫細胞Sf9に、線状バキュロウィルスDNAと上記(1)で造成したプラスミドpVL1393-F2G7をリポフェクション法により導入することにより、組換えバキュロウィルスを作製した。方法は、実施例10に記載の方法を用いた。

(3) FLAGペプチド融合型G7ポリペプチドの分泌生産と精製

上記(2)で作製した組換えウィルスを用いて、FLAGペプチド融合型G7ポリペプチドを昆虫細胞で分泌生産させた。次いで、該ポリペプチドを含有する培養上清から該ポリペプチドを精製した。方法は、実施例10に記載の方法を用いた。

【0342】

精製サンプルの15 μ lを用いてSDS-PAGEを行った後、クーマジ・ブリリアント・ブルーを用いて染色を行った(図22)。pVL1393-F2G7由来の組換えウィルスを感染させたSf21の培養上清から精製したサンプルを使用した際には、40~42 kD付近にG7ポリペプチドと推定されるバンドが確認された。各バンドの分子量の違いは付加する糖鎖の数や大きさの違いに由来すると考えられる。G7ポリペプチドには、N結合型糖鎖の付加が可能な部位が3箇所存在している。

【0343】

以上の結果より、FLAGペプチド融合型G7ポリペプチドが昆虫細胞の培養上清中に分泌生産され、抗FLAG M1アフィニティーゲルを用いて容易に精製可能であることが示された。

(4) FLAGペプチド融合型G7ポリペプチドの β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定

上記(3)で調製した精製サンプル15 μ lを用いて、FLAGペプチド融合

型G 7ポリペプチドの β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の測定を行った。活性測定は実施例 8 の方法を用いた。その結果、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が検出された。生産物へ転換された基質の割合は、2. 1 %であった。一方、ベクターである p V L 1 3 9 3 由来の組換えウイルスを感染させた S F 2 1 の培養上清から同様に精製したサンプルを使用した際には、活性は検出されなかった。

【 0 3 4 4 】

以上の結果より、昆虫細胞で分泌発現させた F L A G ペプチド融合型 G 7 ポリペプチドは β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有することが示された。この結果は、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 7) を F L A G ペプチドとの融合タンパク質として昆虫細胞で分泌生産可能であり、また、生産した融合タンパク質を用いて糖鎖合成が可能なことを示している。

【 0 3 4 5 】

実施例 1 8 分泌型 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (分泌型 G 7) の基質特異性の検討

実施例 1 7 で精製した F L A G ペプチド融合型 G 7 ポリペプチドを用いて、 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 7) の基質特異性の検討を行った。

【 0 3 4 6 】

(1) ピリジルアミノ化オリゴ糖を基質とした解析

実施例 1 1 の (1) で示した方法を用いて、F L A G ペプチド融合型 G 7 ポリペプチドの基質特異性の検討を行った。酵素反応は 37℃ で 16 時間行った。

ピリジルアミノ化 L N n T を基質とした時の活性を 1 0 0 % とした時の相対活性を第 5 表に示した。L N n T を基質とした時の基質の生産物への転換効率 は 3. 7 6 % であった。 β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G 7) は、非還元末端に 2 型糖鎖 (Gal β 1-4GlcNAc) を有する L N n T は良い基質とするが、非還元末端に 1 型糖鎖 (Gal β 1-3GlcNAc) を有する L N T や L N F P - V はほとんど基質としないことが判明した。また、L N n T 中の非還元末端から 2 番目に存在する GlcNAc 残基にフコースが α 1, 3 結合で付加したオリゴ糖である L N F P - I I I は、G 7 の基質になりにくいことも明らかになった。L N T 中の非還元末端から 2 番目に存在する GlcNAc

残基にフコースが α 1、4結合で付加したオリゴ糖であるLNFP-IIやLNDFH-IIは、G7の基質にならないことも明らかになった。以上のことから、G7は非還元末端に未修飾の2型糖鎖を有する糖鎖を良い基質とすると考えられた。

【0347】

第1表、第3表および第5表を比較することにより、 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G7)は、本発明で取得した他の β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G3、G4)とは明らかに基質特異性が異なる酵素であることも判明した。

【0348】

【表5】

第5表

ピリジルアミノ化オリゴ糖を基質とした β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G7)の基質特異性

基質名	糖鎖構造	相対活性 (%)
LNnT	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	100
LNFP-III	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	7.4
LNT	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	7.6
LNFP-II	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	0
LNFP-V	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc	8.1
LNDFH-II	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc	0

【0349】

(2) 無標識オリゴ糖を基質とした解析

実施例11の(2)で示した方法を用いて、FLAGペプチド融合型G7ポリペプチドの基質特異性の検討を行った。酵素反応は37℃で15.5時間行った。

LNnTを基質とした時の活性を100%とした時の相対活性を第6表に示した。LNnTを基質とした時の基質の生産物への転換効率は3.07%であった。 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素(G7)は、4糖のLNnTを最もよい基質とした。G7は2糖のLactoseも比較的よい基質としたが、6糖のLNnHはほとんど基質としなかった。G7は2糖のLacNAcも基質としたが、Lactoseに比較すると活性は低かった。一方、G7はLNTを基質としなかった。

以上のことから、G7は6糖までのポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖の合成

は可能だが、8糖以上のポリ-N-アセチルラクトサミン糖鎖を合成する活性は非常に弱いと考えられた。既知の $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素は、LactoseよりもLacNAcを良い基質とすることが知られている〔J. Biol. Chem., 268, 27118 (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96, 406-411 (1999)〕。したがって、 $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G7) は、既知の酵素とは明らかに基質特異性が異なる酵素であることが判明した。一例として、クローン化された $\beta 3$ GnTの基質特異性 (文献値) を第6表に合わせて示す〔Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96, 406-411 (1999)〕。

第2表、第4表および第6表を比較することにより、 $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G3) は、本発明で取得した他の $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G4、G7) とは明らかに基質特異性が異なる酵素であることも判明した。

【0350】

【表6】

第6表

無標識オリゴ糖を基質とした $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素 (G7) の基質特異性

基質名	糖鎖構造	相対活性 (%)	
		G7	$\beta 3$ GnT
LNnT	Gal $\beta 1$ -4GlcNAc $\beta 1$ -3Gal $\beta 1$ -4Glc	100	100
LNT	Gal $\beta 1$ -3GlcNAc $\beta 1$ -3Gal $\beta 1$ -4Glc	0	6
LNnH	Gal $\beta 1$ -4GlcNAc $\beta 1$ -3Gal $\beta 1$ -4GlcNAc $\beta 1$ -3Gal $\beta 1$ -4Glc	0.05	
Lactose	Gal $\beta 1$ -4Glc	32.6	67.1
LacNAc	Gal $\beta 1$ -4GlcNAc	8.5	95.5

一方、GlcNAcおよびGlcNAc $\beta 1$ -3Gal $\beta 1$ -4Glcを受容基質として、分泌型G7の $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性を測定した際には、活性は検出されなかった。したがって、G7は $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性は有していないことが明らかになった。方法は実施例11の(2)に記載の方法を用いた。

【0351】

実施例19 G3、G4、G7の各遺伝子転写産物の各種癌組織における発現量の検討

各種癌組織と該癌組織周辺の正常組織における、G3、G4、G7の各遺伝子転写産物の発現量の検討を行った。方法は文献 [International Journal of Cancer, 83, 70 (1999)、Glycobiology, 9, 607 (1999)、Laboratory Investigation, 78, 797 (1998)] に従った。

【0352】

(1) 各種正常組織および癌組織由来の一本鎖cDNAの合成

大腸癌(10例)、胃癌(7例)、および肺癌(6例)の患者から、癌組織と癌組織周辺の正常組織を採取した。上記の各組織から、acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform法を用いて全RNAは調製し、該全RNAを鋳型として一本鎖cDNAの合成を行った。キット(SUPERSCRIPT Preamplification System; GIBCO社製)を用いて、5 μ gの全RNAから一本鎖cDNAを合成し、各々水で50倍希釈してPCRの鋳型として使用した。プライマーとしては、オリゴ(dT)プライマーを用いた。

【0353】

(2) スタンダードおよび内部コントロールの調製

pBS-G3、pBS-G4-2、pT7B-G7を用いて、スタンダードおよび内部コントロールの造成を行った[下記(a)～(f)参照]。

β -アクチン転写産物の定量においては、pUC119-ACTおよびpUC119-ACTdをcDNA部分を切り出す制限酵素(HindIIIとAsp718)で切断して直鎖状DNAに変換した後、それぞれスタンダードおよび内部コントロールとして用いた[J. Biol. Chem., 269, 14730(1994)、特開平06-181759]。各プラスミドが完全に切断された事を確認後、酵母のトランスファRNAを1 μ g/mlで含む水で段階的に希釈して使用した。

【0354】

(a) G3転写産物定量用スタンダードの調製

pBS-G3を制限酵素BglIIで切断し、4.5kbのBglII断片を取得した。該断片を結合することにより、pBS-G3Sを造成した。pBS-G3Sを制限酵素XbaIとAccIで切断し、G3cDNA部分を直鎖状DNAとしたものを定量用のスタンダードとして用いた。プラスミドが完全に切断さ

れたことを確認後、酵母のトランスファーRNAを $1\mu\text{g}/\text{ml}$ で含む水で段階的に希釈して使用した。

【0355】

(b) G3転写産物定量用内部コントロールの調製

上記(a)で造成したpBS-G3Sにおいて、G3cDNA中のEco81I - PfIMI間227bpを欠失させることによりpBS-G3Sdを作製した。pBS-G3Sを制限酵素Eco81IとPfIMIで切断し、4.3kbのEco81I - PfIMI断片を取得した。該断片を結合することにより、pBS-G3Sdを造成した。pBS-G3Sdを制限酵素XbaIとAccIで切断し、G3cDNA部分を直鎖状DNAとしたものを定量用の内部コントロールとして用いた。プラスミドが完全に切断されたことを確認後、酵母のトランスファーRNAを $1\mu\text{g}/\text{ml}$ で含む水で段階的に希釈して使用した。

【0356】

—(c) G4転写産物定量用スタンダードの調製 —

実施例3で取得したpBS-G4-2を制限酵素XbaIとClaIで切断し、G4cDNA部分を直鎖状DNAとしたものを定量用のスタンダードとして用いた。プラスミドが完全に切断されたことを確認後、酵母のトランスファーRNAを $1\mu\text{g}/\text{ml}$ で含む水で段階的に希釈して使用した。

【0357】

(d) G4転写産物定量用内部コントロールの調製

実施例3で取得したpBS-G4-2において、G4cDNA中のBstEII - PmlI間183bpを欠失させることによりpBS-G4-2dを作製した。pBS-G4-2を制限酵素BstEIIとPmlIで切断し、4.9kbのBstEII - PmlI断片を取得した。該断片を結合することにより、pBS-G4-2dを造成した。pBS-G4-2dをXbaIとClaIで切断し、G4cDNA部分を直鎖状DNAとしたものを定量用の内部コントロールとして用いた。プラスミドが完全に切断されたことを確認後、酵母のトランスファーRNAを $1\mu\text{g}/\text{ml}$ で含む水で段階的に希釈して使用した。

【0358】

(e) G7転写産物定量用スタンダードの調製

実施例4で取得したpT7B-G7を制限酵素Tth111IとNarIで切断し、G4cDNA部分を直鎖状DNAとしたものを定量用のスタンダードとして用いた。プラスミドが完全に切断されたことを確認後、酵母の転スファ- RNAを $1\mu\text{g}/\text{ml}$ で含む水で段階的に希釈して使用した。

【0359】

(f) G7転写産物定量用内部コントロールの調製

実施例4で取得したpT7B-G7において、G7cDNA中のTth111I-NarI間209bpを欠失させることによりpT7B-G7dを作製した。pT7B-G7を制限酵素Tth111IとNarIで切断し、4.0kbのTth111I-NarI断片を取得した。該断片を結合することにより、pT7B-G7dを造成した。pT7B-G7dをHincIIとSmaIで切断し、G7cDNA部分を直鎖状DNAとしたものを定量用の内部コントロールとして用いた。プラスミドが完全に切断されたことを確認後、酵母の転スファ- RNAを $1\mu\text{g}/\text{ml}$ で含む水で段階的に希釈して使用した。

【0360】

(3) 定量的PCR法を用いたG3、G4、G7の各遺伝子の転写産物の定量

(1)で調製した正常組織および癌組織由来の一本鎖cDNAを鋳型としてPCRを行った。PCR用プライマーとしては、G3転写物検出用にはCB489(配列番号35)とCB490(配列番号36)を、G4転写物検出用にはCB495(配列番号37)とCB492(配列番号38)を、G7転写物検出用にはCB493(配列番号39)とCB494(配列番号40)を使用した。。また、(2)で作製したスタンダードと内部コントロールを鋳型として同様にPCRを行うことにより検量線を作製した。

【0361】

上記各組織由来のcDNA $10\mu\text{l}$ および内部コントロール用プラスミド $10\mu\text{l}$ (10fg)を含む $50\mu\text{l}$ の反応溶液 [$10\text{mmol}/\text{l}$ Tris-HCl (pH8.3)、 $50\text{mmol}/\text{l}$ KCl、 $1.5\text{mmol}/\text{l}$ MgCl₂、 $0.2\text{mmol}/\text{l}$ dNTP、 0.001% (w/v) ゼラチン、 0.2

μ M 遺伝子特異的プライマー] で、DNAポリメラーゼAmpliTaq Gold™ (Park in Elmer社製) を用いてPCRを行った。

【0362】

PCRは、以下の条件で行った。

G3転写産物定量の際は、95℃で11分間の加熱後、95℃-1分間、55℃-1分間、72℃-2分間からなる反応を1サイクルとして、42サイクル行った。

G4転写産物定量の際は、95℃で11分間の加熱後、95℃-1分間、65℃-1分間、72℃-2分間からなる反応を1サイクルとして、42サイクル行った。

G7転写産物定量の際は、95℃で11分間の加熱後、95℃-1分間、65℃-1分間、72℃-2分間からなる反応を1サイクルとして、44サイクル行った。

β -アクチン転写産物定量の際は、95℃で11分間の加熱後、95℃-1分間、65℃-1分間、72℃-2分間からなる反応を1サイクルとして、24サイクル行った。

【0363】

PCR後の溶液のうち10 μ lを1%のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、写真を撮影した。写真をNIHイメージシステムによりスキヤニングすることにより増幅した断片の染色の強さを測定し、増幅量とした。より正確な転写産物の定量を行なうため、PCRのサイクル数を変えて同様のPCRを行った。スタンダードおよび内部コントロールの量はPCRのサイクル数に応じて変化させた。

【0364】

細胞由来の一本鎖cDNAのかわりに上記(a)、(c)、(e)で調製したスタンダードを1.25fg、2.5fg、5fg、10fg、20fg、40fg用いてPCRを行い、増幅断片の増幅量を測定し、cDNAの量と断片の増幅量をプロットして検量線を作成した。

【0365】

上記G3転写産物定量用プライマーを用いた場合は、G3転写産物およびG3のスタンダードからは646bpのDNA断片が、G3の内部コントロールからは419bpのDNA断片が増幅する。

上記G4転写産物定量用プライマーを用いた場合は、G4転写産物およびG4のスタンダードからは726bpのDNA断片が、G4の内部コントロールからは540bpのDNA断片が増幅する。

上記G7転写産物定量用プライマーを用いた場合は、G7転写産物およびG7のスタンダードからは649bpのDNA断片が、G7の内部コントロールからは439bpのDNA断片が増幅する。

【0366】

上記検量線と各組織由来cDNAでの断片の増幅量から、各組織でのcDNA量を計算し、転写産物量とした。なお、 β -アクチンは各組織で普遍的に発現している遺伝子と考えられるため、どの組織においてもその発現量は同程度と考えられる。従って、各組織における β -アクチン転写物の発現量の差は、cDNA合成反応の効率の差と考えられるため、各遺伝子の発現量を比較する際には β -アクチン転写物の発現量も考慮した。

【0367】

大腸癌患者（10例）の癌組織とその周辺の正常組織におけるG3、G4およびG7転写産物の量を、 β -アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として、第7表に示した。

大腸癌患者の癌組織とその周辺の正常組織では、ほとんどの場合G3およびG4転写物の発現がみられたが、癌組織と正常組織における発現量に相関はみられなかった。一方、G7転写物は癌組織および正常組織いずれにおいてもほとんど発現していなかった。発現量（相対値）が1以下の場合、ほとんど発現していないととらえることができる。

【0368】

【表 7】

第 7 表			転写産物量		
サンプル名	患者 No.	組織	G3	G4	G7
10N	10	正常	35	27	0.51
10T	10	癌	5.6	5.1	0.20
11N	11	正常	2.3	5.1	0.17
11T	11	癌	4.4	7.4	0.12
13N	13	正常	7.8	5.3	0.055
13T	13	癌	6.0	0.070	0.01>
15N	15	正常	0.01>	0.01>	0.01>
15T	15	癌	5.4	5.0	0.01>
17N	17	正常	3.9	5.1	0.085
17T	17	癌	4.4	24	1.5
18N	18	正常	6.9	35	0.086
18T	18	癌	3.3	5.6	0.01>
19N	19	正常	7.4	6.3	0.01>
19T	19	癌	3.8	6.4	0.16
22N	22	正常	3.6	4.0	0.01>
22T	22	癌	8.6	5.0	0.01>
23N	23	正常	3.5	4.9	0.01>
23T	23	癌	4.6	5.2	0.057
24N	24	正常	4.9	7.3	0.14
24T	24	癌	3.4	6.2	0.090

【0369】

胃癌患者（7例）の癌組織とその周辺の正常組織におけるG3、G4およびG7転写産物の量を、 β -アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として、第8表に示した。

胃癌患者の癌組織とその周辺の正常組織では、ほとんどの場合G3およびG4転写物の発現がみられたが、癌組織と正常組織における発現量に相関はみられなかった。一方、G7転写物は癌組織および正常組織いずれにおいてもほとんど発現していなかった。

【0370】

【表 8】

第 8 表			転写産物量		
サンプル名	患者No.	組織	G3	G4	G7
MK2N	MK2	正常	56	120	0.01>
MK2T	MK2	癌	8.5	12	0.26
MK4N	MK4	正常	3.2	14	0.067
MK4T	MK4	癌	4.3	4.8	0.038
MK5N	MK5	正常	0.01>	4.5	0.059
MK5T	MK5	癌	4.6	6.0	0.26
MK6N	MK6	正常	6.0	8.0	0.01>
MK6T	MK6	癌	8.6	8.6	0.077
MK7N	MK7	正常	12	12	0.01>
MK7T	MK7	癌	18	17	0.15
MK10N	MK10	正常	7.3	5.5	0.01>
MK10T	MK10	癌	5.8	4.0	0.18
MK12N	MK12	正常	4.8	12	0.01>
MK12T	MK12	癌	17	13	0.01>

【0371】

肺癌患者（6例）の癌組織とその周辺の正常組織におけるG3、G4およびG7転写産物の量を、 β -アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として、第9表に示した。

肺癌患者の癌組織とその周辺の正常組織では、全ての場合でG3転写物の発現がみられたが、癌組織と正常組織における発現量に相関はみられなかった。G7転写物は癌組織および正常組織いずれにおいてもほとんど発現していなかった。G4転写物に関しては、正常組織ではほとんど発現がみられなかったのに対し、6例中5例の癌組織において明らかな発現がみられた。これは、癌化に伴ってG4転写産物が発現することを示唆している。

【0372】

【表 9】

第 9 表					
サンプル名	患者 N o.	組織	転写産物量		
			G3	G4	G7
LC11N	LC11	正常	45	0.01>	0.37
LC11T	LC11	癌	4.2	1.5	0.082
LC12N	LC12	正常	7.9	0.01>	0.059
LC12T	LC12	癌	12	3.4	0.14
LC15N	LC15	正常	8.6	0.01>	0.077
LC15T	LC15	癌	16	4.8	0.33
LC20N	LC20	正常	27	0.20	0.25
LC20T	LC20	癌	19	2.9	0.66
LC23N	LC23	正常	3.2	0.01>	0.01>
LC23T	LC23	癌	3.9	0.01>	0.12
LC25N	LC25	正常	17	0.056	0.15
LC25T	LC25	癌	5.3	2.2	0.16

【0373】

そこで、さらに肺癌患者 16 例についても同様の解析を行った。上記 6 例の結果と合せ、肺癌患者（22 例）の癌組織とその周辺の正常組織における G3、G4 および G7 転写産物の発現量を、 β -アクチンの転写産物の量を 1000 とした時の相対値として第 10 表に示した。

肺癌の分類ごとに整理して発現量を示した。

肺癌患者（22 例）の癌組織とその周辺の正常組織における G3、G4 および G7 転写産物量。 β -アクチンの転写産物の量を 1000 とした時の相対値として示した。

【0374】

【表 10】

第 10 表

患者No.	肺癌の分類	G 4 転写産物量	
		正常組織	癌組織
LC2	Adenocarcinoma	0.01>	0.94
LC9	Adenocarcinoma	0.10	2.2
LC11	Adenocarcinoma	0.01>	1.2
LC12	Adenocarcinoma	0.01>	2.3
LC13	Adenocarcinoma	0.01>	9.8
LC15	Adenocarcinoma	0.14	2.9
LC17	Adenocarcinoma	0.21	2.0
LC21	Adenocarcinoma	0.01>	6.4
LC24	Adenocarcinoma	0.01>	0.01>
LC25	Adenocarcinoma	0.01>	1.4
LC26	Adenocarcinoma	0.01>	1.7
LC28	Adenocarcinoma	0.33	2.6
LC8	Adenocarcinoma(mod)	0.01>	5.8
LC14	Adenocarcinoma(mod)	1.0	7.6
LC10	Adenocarcinoma(well)	0.01>	1.5
LC18	Adenocarcinoma(well)	0.01>	2.5
LC3	Squamous cell carcinoma	0.018	0.56
LC6	Squamous cell carcinoma	0.01>	0.21
LC16	Squamous cell carcinoma	0.027	3.4
LC20	Squamous cell carcinoma	0.53	2.6
LC23	Mesothelioma	0.21	0.14
LC27	small cell carcinoma	0.01>	0.11

【0375】

発現量（相対値）が1以上のものを発現しているとする、正常組織でG 4 転写物が発現していたのは全22例中1例で、この場合の発現量も1と低い。一方、癌組織でG 4 転写物が発現していたのは全22例中17例である。また、正常組織でG 4 転写物の発現がみられた1例（表中のLC14）においても、癌組織での発現量は7.6と、癌化に伴って明らかに増加していた。Adenocarcinomaだけをみると、全15例中14例（図中のLC24以外）においては、癌化に伴いG 4 転写産物の発現量が増加していることがわかる。Squamous cell carcinomaにおいては、4例中2例で癌化とG 4 転写産物の発現量に相関がみられた。

【0376】

以上の結果は、肺癌（特にAdenocarcinoma）においては、癌化に伴ってG 4 転写産物が発現することを示している。正常組織でG 4 転写物の発現がみられた1例（図中のLC14）においては、正常組織に癌組織が混じっていた可能性も考

えられる。G4 遺伝子は、正常の肺組織でほとんど発現しておらず、癌化に伴ってはじめて発現してくる遺伝子であると考えられる。したがって、肺組織における G4 遺伝子や G4 蛋白質の発現量を調べることにより、肺癌の診断が可能と考えられる。

【0377】

【発明の効果】

本発明は、 $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードする DNA、該 DNA が組み込まれた組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法および免疫染色法、該ポリペプチドを用いた $\text{GlcNAc } \beta 1\text{-}3\text{Gal}$ 構造を有する糖鎖、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法、該組換え体ベクターを保有する形質転換体を用いた $\text{GlcNAc } \beta 1\text{-}3\text{Gal}$ 構造を有する糖鎖、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質のスクリーニング法、該ポリペプチドの有する $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を変動させる物質のスクリーニング法、該 DNA あるいは該抗体を用いた炎症や癌（大腸癌、膵臓癌、胃癌など）の診断法、該 DNA、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質あるいは該ポリペプチドの有する $\beta 1,3$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を変動させる物質を用いた炎症や癌（大腸癌、膵臓癌、胃癌など）の治療法を提供することができる。

【0378】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 8-G7cDNA の塩基配列

配列番号 9-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 10-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 11-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 12-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 13-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 14 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 15 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 16 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 17 - 人工配列の説明：FLAGペプチドのアミノ酸配列

配列番号 18 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 19 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 20 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 21 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 22 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 23 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 24 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 25 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 26 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 27 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 28 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 29 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 30 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 31 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 32 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 33 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 34 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 35 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 36 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 37 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 38 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 39 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 40 - 人工配列の説明：合成DNA

【0379】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Novel Polypeptides

<130> H12-0541T4

<140>

<141>

<150> JP 99/183437

<151> 2000-06-29

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 397

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Val Gly Arg Arg Arg Ile Lys Leu Leu Gly Ile Leu Met Met

1

5

10

15

Ala Asn Val Phe Ile Tyr Phe Ile Met Glu Val Ser Lys Ser Ser Ser

20

25

30

Gln Glu Lys Asn Gly Lys Gly Glu Val Ile Ile Pro Lys Glu Lys Phe

35

40

45

Trp Lys Ile Ser Thr Pro Pro Glu Ala Tyr Trp Asn Arg Glu Gln Glu

50

55

60

Lys Leu Asn Arg Gln Tyr Asn Pro Ile Leu Ser Met Leu Thr Asn Gln

65

70

75

80

Thr Gly Glu Ala Gly Arg Leu Ser Asn Ile Ser His Leu Asn Tyr Cys

85

90

95

Glu Pro Asp Leu Arg Val Thr Ser Val Val Thr Gly Phe Asn Asn Leu

100

105

110

Pro Asp Arg Phe Lys Asp Phe Leu Leu Tyr Leu Arg Cys Arg Asn Tyr

115

120

125

Ser Leu Leu Ile Asp Gln Pro Asp Lys Cys Ala Lys Lys Pro Phe Leu

130

135

140

~~Leu Leu Ala Ile Lys Ser Leu Thr Pro His Phe Ala Arg Arg Gln Ala~~

~~145~~

~~150~~

~~155~~

~~160~~

Ile Arg Glu Ser Trp Gly Gln Glu Ser Asn Ala Gly Asn Gln Thr Val

165

170

175

Val Arg Val Phe Leu Leu Gly Gln Thr Pro Pro Glu Asp Asn His Pro

180

185

190

Asp Leu Ser Asp Met Leu Lys Phe Glu Ser Glu Lys His Gln Asp Ile

195

200

205

Leu Met Trp Asn Tyr Arg Asp Thr Phe Phe Asn Leu Ser Leu Lys Glu

210

215

220

Val Leu Phe Leu Arg Trp Val Ser Thr Ser Cys Pro Asp Thr Glu Phe

225

230

235

240

Val Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn Thr His His Ile Leu

245

250

255

Asn Tyr Leu Asn Ser Leu Ser Lys Thr Lys Ala Lys Asp Leu Phe Ile

260

265

270

Gly Asp Val Ile His Asn Ala Gly Pro His Arg Asp Lys Lys Leu Lys

275

280

285

Tyr Tyr Ile Pro Glu Val Val Tyr Ser Gly Leu Tyr Pro Pro Tyr Ala

290

295

300

Gly Gly Gly Gly Phe Leu Tyr Ser Gly His Leu Ala Leu Arg Leu Tyr

305

310

315

320

His Ile Thr Asp Gln Val His Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Tyr Thr
325 330 335

Gly Met Cys Leu Gln Lys Leu Gly Leu Val Pro Glu Lys His Lys Gly
340 345 350

Phe Arg Thr Phe Asp Ile Glu Glu Lys Asn Lys Asn Asn Ile Cys Ser
355 360 365

Tyr Val Asp Leu Met Leu Val His Ser Arg Lys Pro Gln Glu Met Ile
370 375 380

Asp Ile Trp Ser Gln Leu Gln Ser Ala His Leu Lys Cys
385 390 395

<210> 2

<211> 372

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Tyr Leu Arg His Arg Arg Pro Asn Ala Thr Leu Ile Leu Ala
1 5 10 15

Ile Gly Ala Phe Thr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val Ser Pro Pro
20 25 30

Thr Cys Lys Val Gln Glu Gln Pro Pro Ala Ile Pro Glu Ala Leu Ala

35

40

45

Trp Pro Thr Pro Pro Thr Arg Pro Ala Pro Ala Pro Cys His Ala Asn

50

55

60

Thr Ser Met Val Thr His Pro Asp Phe Ala Thr Gln Pro Gln His Val

65

70

75

80

Gln Asn Phe Leu Leu Tyr Arg His Cys Arg His Phe Pro Leu Leu Gln

85

90

95

Asp Val Pro Pro Ser Lys Cys Ala Gln Pro Val Phe Leu Leu Leu Val

— 100

105

110

Ile Lys Ser Ser Pro Ser Asn Tyr Val Arg Arg Glu Leu Leu Arg Arg

115

120

125

Thr Trp Gly Arg Glu Arg Lys Val Arg Gly Leu Gln Leu Arg Leu Leu

130

135

140

Phe Leu Val Gly Thr Ala Ser Asn Pro His Glu Ala Arg Lys Val Asn

145

150

155

160

Arg Leu Leu Glu Leu Glu Ala Gln Thr His Gly Asp Ile Leu Gln Trp

165

170

175

Asp Phe His Asp Ser Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Gln Val Leu Phe

180

185

190

Leu Gln Trp Gln Glu Thr Arg Cys Ala Asn Ala Ser Phe Val Leu Asn

195

200

205

Gly Asp Asp Asp Val Phe Ala His Thr Asp Asn Met Val Phe Tyr Leu

210

215

220

Gln Asp His Asp Pro Gly Arg His Leu Phe Val Gly Gln Leu Ile Gln

225

230

235

240

Asn Val Gly Pro Ile Arg Ala Phe Trp Ser Lys Tyr Tyr Val Pro Glu

245

250

255

Val Val Thr Gln Asn Glu Arg Tyr Pro Pro Tyr Cys Gly Gly Gly Gly

260

265

270

Phe Leu Leu Ser Arg Phe Thr Ala Ala Ala Leu Arg Arg Ala Ala His

275

280

285

Val Leu Asp Ile Phe Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu Gly Met Cys Leu

290

295

300

Glu Leu Glu Gly Leu Lys Pro Ala Ser His Ser Gly Ile Arg Thr Ser

305

310

315

320

Gly Val Arg Ala Pro Ser Gln His Leu Ser Ser Phe Asp Pro Cys Phe

325

330

335

Tyr Arg Asp Leu Leu Leu Val His Arg Phe Leu Pro Tyr Glu Met Leu

340

345

350

Leu Met Trp Asp Ala Leu Asn Gln Pro Asn Leu Thr Cys Gly Asn Gln

355

360

365

Thr Gln Ile Tyr

370

<210> 3

<211> 372

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Lys Tyr Leu Arg His Arg Arg Pro Asn Ala Thr Leu Ile Leu Ala

1

5

10

15

Ile Gly Ala Phe Thr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val Ser Pro Pro

20

25

30

Thr Cys Lys Val Gln Glu Gln Pro Pro Ala Ile Pro Glu Ala Leu Ala

35

40

45

Trp Pro Thr Pro Pro Thr Arg Pro Ala Pro Ala Pro Cys His Ala Asn

50

55

60

Thr Ser Met Val Thr His Pro Asp Phe Ala Thr Gln Pro Gln His Val

65

70

75

80

Gln Asn Phe Leu Leu Tyr Arg His Cys Arg His Phe Pro Leu Leu Gln

85

90

95

Asp Val Pro Pro Ser Lys Cys Ala Gln Pro Val Phe Leu Leu Leu Val

100

105

110

Ile Lys Ser Ser Pro Ser Asn Tyr Val Arg Arg Glu Leu Leu Arg Arg

115

120

125

Thr Trp Gly Arg Glu Arg Lys Val Arg Gly Leu Gln Leu Arg Leu Leu

130

135

140

Phe Leu Val Gly Thr Ala Ser Asn Pro His Glu Ala Arg Lys Val Asn

145

150

155

160

Arg Leu Leu Glu Leu Glu Ala Gln Thr His Gly Asp Ile Leu Gln Trp

165

170

175

Asp Phe His Asp Ser Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Gln Val Leu Phe

180

185

190

Leu Gln Trp Gln Glu Thr Arg Cys Ala Asn Ala Ser Phe Val Leu Asn

195

200

205

Gly Asp Asp Asp Val Phe Ala His Thr Asp Asn Met Val Phe Tyr Leu

210

215

220

Gln Asp His Asp Pro Gly Arg His Leu Phe Val Gly Gln Leu Ile Gln

225 230 235 240

Asn Val Gly Pro Ile Arg Ala Phe Trp Ser Lys Tyr Tyr Val Pro Glu

245 250 255

Val Val Thr Gln Asn Glu Arg Tyr Pro Pro Tyr Cys Gly Gly Gly Gly

260 265 270

Phe Leu Leu Ser Arg Phe Thr Ala Ala Ala Leu Arg Arg Ala Ala His

275 280 285

Val Leu Asp Ile Phe Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu Gly Met Cys Leu

290 295 300

Glu Leu Glu Gly Leu Lys Pro Ala Ser His Ser Gly Ile Arg Thr Ser

305 310 315 320

Gly Val Arg Ala Pro Ser Gln Arg Leu Ser Ser Phe Asp Pro Cys Phe

325 330 335

Tyr Arg Asp Leu Leu Leu Val His Arg Phe Leu Pro Tyr Glu Met Leu

340 345 350

Leu Met Trp Asp Ala Leu Asn Gln Pro Asn Leu Thr Cys Gly Asn Gln

355 360 365

Thr Gln Ile Tyr

370

<210> 4

<211> 378

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Leu Pro Pro Gln Pro Ser Ala Ala His Gln Gly Arg Gly Gly Arg

1

5

10

15

Ser Gly Leu Leu Pro Lys Gly Pro Ala Met Leu Cys Arg Leu Cys Trp

20

25

30

Leu Val Ser Tyr Ser Leu Ala Val Leu Leu Leu Gly Cys Leu Leu Phe

35

40

45

Leu Arg Lys Ala Ala Lys Pro Ala Gly Asp Pro Thr Ala His Gln Pro

50

55

60

Phe Trp Ala Pro Pro Thr Pro Arg His Ser Arg Cys Pro Pro Asn His

65

70

75

80

Thr Val Ser Ser Ala Ser Leu Ser Leu Pro Ser Arg His Arg Leu Phe

85

90

95

Leu Thr Tyr Arg His Cys Arg Asn Phe Ser Ile Leu Leu Glu Pro Ser

100

105

110

Gly Cys Ser Lys Asp Thr Phe Leu Leu Leu Ala Ile Lys Ser Gln Pro

115

120

125

Gly His Val Glu Arg Arg Ala Ala Ile Arg Ser Thr Trp Gly Arg Val

130

135

140

Gly Gly Trp Ala Arg Gly Arg Gln Leu Lys Leu Val Phe Leu Leu Gly

145

150

155

160

Val Ala Gly Ser Ala Pro Pro Ala Gln Leu Leu Ala Tyr Glu Ser Arg

165

170

175

Glu Phe Asp Asp Ile Leu Gln Trp Asp Phe Thr Glu Asp Phe Phe Asn

180

185

190

Leu Thr Leu Lys Glu Leu His Leu Gln Arg Trp Val Val Ala Ala Cys

195

200

205

Pro Gln Ala His Phe Met Leu Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val His

210

215

220

Val Pro Asn Val Leu Glu Phe Leu Asp Gly Trp Asp Pro Ala Gln Asp

225

230

235

240

Leu Leu Val Gly Asp Val Ile Arg Gln Ala Leu Pro Asn Arg Asn Thr

245

250

255

Lys Val Lys Tyr Phe Ile Pro Pro Ser Met Tyr Arg Ala Thr His Tyr

260

265

270

Pro Pro Tyr Ala Gly Gly Gly Gly Tyr Val Met Ser Arg Ala Thr Val
275 280 285

Arg Arg Leu Gln Ala Ile Met Glu Asp Ala Glu Leu Phe Pro Ile Asp
290 295 300

Asp Val Phe Val Gly Met Cys Leu Arg Arg Leu Gly Leu Ser Pro Met
305 310 315 320

His His Ala Gly Phe Lys Thr Phe Gly Ile Arg Arg Pro Leu Asp Pro
325 330 335

Leu Asp Pro Cys Leu Tyr Arg Gly Leu Leu Leu Val His Arg Leu Ser
340 345 350

Pro Leu Glu Met Trp Thr Met Trp Ala Leu Val Thr Asp Glu Gly Leu
355 360 365

Lys Cys Ala Ala Gly Pro Ile Pro Gln Arg
370 375

<210> 5

<211> 1912

<212> DNA

<213> *Corynebacterium* sp.NK-1

<400> 5

ggcgccggca gcgtcagcag cggcaacaag tgccggagta gcagagccaa gccggagcag 60

tccctgccgc cgacaccgcc gggccgccc tccggggcgc cgcgcatgga gcgtgagctg 120

cggcggtcgc cgggctgagc cgcgcggagc gccgggacgt ggatgtggcc gcgatctccc 180

gcccttgccc ccgccccgcc gagctggagc tgcctccgga caagatatga gaa atg 236

Met

1

agt gtt gga cgt cga aga ata aag ttg ttg ggt atc ctg atg atg gca 284

Ser Val Gly Arg Arg Arg Ile Lys Leu Leu Gly Ile Leu Met Met Ala

5

10

15

aat gtc ttc att tat ttt att atg gaa gtc tcc aaa agc agt agc caa 332

Asn Val Phe Ile Tyr Phe Ile Met Glu Val Ser Lys Ser Ser Ser Gln

20

25

30

gaa aaa aat gga aaa ggg gaa gta ata ata ccc aaa gag aag ttc tgg 380

Glu Lys Asn Gly Lys Gly Glu Val Ile Ile Pro Lys Glu Lys Phe Trp

35

40

45

aag ata tct acc cct ccc gag gca tac tgg aac cga gag caa gag aag 428

Lys Ile Ser Thr Pro Pro Glu Ala Tyr Trp Asn Arg Glu Gln Glu Lys

50

55

60

65

ctg aac cgg cag tac aac ccc atc ctg agc atg ctg acc aac cag acg 476

Leu Asn Arg Gln Tyr Asn Pro Ile Leu Ser Met Leu Thr Asn Gln Thr

70

75

80

ggg gag gcg ggc agg ctc tcc aat ata agc cat ctg aac tac tgc gaa 524

Gly Glu Ala Gly Arg Leu Ser Asn Ile Ser His Leu Asn Tyr Cys Glu

85

90

95

cct gac ctg agg gtc acg tcg gtg gtt acg ggt ttt aac aac ttg ccg 572

Pro Asp Leu Arg Val Thr Ser Val Val Thr Gly Phe Asn Asn Leu Pro

100

105

110

gac aga ttt aaa gac ttt ctg ctg tat ttg aga tgc cgc aat tat tca 620

Asp Arg Phe Lys Asp Phe Leu Leu Tyr Leu Arg Cys Arg Asn Tyr Ser

115

120

125

ctg ctt ata gat cag ccg gat aag tgt gca aag aaa cct ttc ttg ttg 668

Leu Leu Ile Asp Gln Pro Asp Lys Cys Ala Lys Lys Pro Phe Leu Leu

130

135

140

145

ctg gcg att aag tcc ctc act cca cat ttt gcc aga agg caa gca atc 716

Leu Ala Ile Lys Ser Leu Thr Pro His Phe Ala Arg Arg Gln Ala Ile

150

155

160

cgg gaa tcc tgg ggc caa gaa agc aac gca ggg aac caa acg gtg gtg 764

Arg Glu Ser Trp Gly Gln Glu Ser Asn Ala Gly Asn Gln Thr Val Val

165

170

175

cga gtc ttc ctg ctg ggc cag aca ccc cca gag gac aac cac ccc gac 812

Arg Val Phe Leu Leu Gly Gln Thr Pro Pro Glu Asp Asn His Pro Asp

180

185

190

ctt tca gat atg ctg aaa ttt gag agt gag aag cac caa gac att ctt 860

Leu Ser Asp Met Leu Lys Phe Glu Ser Glu Lys His Gln Asp Ile Leu

195

200

205

atg tgg aac tac aga gac act ttc ttc aac ttg tct ctg aag gaa gtg 908

Met Trp Asn Tyr Arg Asp Thr Phe Phe Asn Leu Ser Leu Lys Glu Val

210

215

220

225

ctg ttt ctc agg tgg gta agt act tcc tgc cca gac act gag ttt gtt 956

Leu Phe Leu Arg Trp Val Ser Thr Ser Cys Pro Asp Thr Glu Phe Val

230

235

240

ttc aag ggc gat gac gat gtt ttt gtg aac acc cat cac atc ctg aat 1004

Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn Thr His His Ile Leu Asn

245

250

255

tac ttg aat agt tta tcc aag acc aaa gcc aaa gat ctc ttc ata ggt 1052

Tyr Leu Asn Ser Leu Ser Lys Thr Lys Ala Lys Asp Leu Phe Ile Gly

260

265

270

gat gtg atc cac aat gct gga cct cat cgg gat aag aag ctg aag tac 1100

Asp Val Ile His Asn Ala Gly Pro His Arg Asp Lys Lys Leu Lys Tyr

275

280

285

tac atc cca gaa gtt gtt tac tct ggc ctc tac cca ccc tat gca ggg 1148

Tyr Ile Pro Glu Val Val Tyr Ser Gly Leu Tyr Pro Pro Tyr Ala Gly

290

295

300

305

gga ggg ggg ttc ctc tac tcc ggc cac ctg gcc ctg agg ctg tac cat 1196

Gly Gly Gly Phe Leu Tyr Ser Gly His Leu Ala Leu Arg Leu Tyr His

310

315

320

atc act gac cag gtc cat ctc tac ccc att gat gac gtt tat act gga 1244

Ile Thr Asp Gln Val His Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Tyr Thr Gly

325

330

335

atg tgc ctt cag aaa ctc ggc ctc gtt cca gag aaa cac aaa ggc ttc 1292

Met Cys Leu Gln Lys Leu Gly Leu Val Pro Glu Lys His Lys Gly Phe

340

345

350

agg aca ttt gat atc gag gag aaa aac aaa aat aac atc tgc tcc tat 1340

Arg Thr Phe Asp Ile Glu Glu Lys Asn Lys Asn Asn Ile Cys Ser Tyr

355

360

365

gta gat ctg atg tta gta cat agt aga aaa cct caa gag atg att gat 1388

Val Asp Leu Met Leu Val His Ser Arg Lys Pro Gln Glu Met Ile Asp

370

375

380

385

att tgg tct cag ttg cag agt gct cat tta aaa tgc taaaatagat 1434

Ile Trp Ser Gln Leu Gln Ser Ala His Leu Lys Cys

390

395

acaaactcaa ttttgcatag aaaggtgtat ttgaaatagt tcccatgttg tgttctcaca 1494

ttagagtaat ttctatatta aaccatgaaa attgccttta tgagtgatac ccatttgagg 1554

gcctctaaac ccttcaattt ggtactcacg tgaagaggga aagcggaaga tgtaatttt 1614

tttttatgga tgatatggca ggatgattgg ttctgatctt accggctagt ggtcattttt 1674

aaaaaacttg taccctctta tctgaaatcc tgtttctgga atttggccat tttaagtgat 1734

tttgtttgcc cttctctata atattcctac ttcccataat aatgactgat ttatttgta 1794

ttcaggtatt tataaaccta ttggctacaa agactttgtt aaactttatc cagtggtttt 1854

cgtgaaatgg aattatgttt attttatgg gatttgggia aattttaaat tgtctaga 1912

<210> 6

<211> 2205

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ggccaggaac ccgcaaggcg ctgcttggtc atctccagcc acggggagct cattccctag 60

cagcgggcca gacccaagga gccgcccagg aggctcctca ggccgacccc agaccctggc 120

tggccagg atg aag tat ctc cgg cac cgg cgg ccc aat gcc acc ctc att 170

Met Lys Tyr Leu Arg His Arg Arg Pro Asn Ala Thr Leu Ile

1

5

10

ctg gcc atc ggc gct ttc acc ctc ctc ctc ttc agt ctg cta gtg tca 218

Leu Ala Ile Gly Ala Phe Thr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val Ser

15

20

25

30

cca ccc acc tgc aag gtc cag gag cag cca ccg gcg atc ccc gag gcc 266

Pro Pro Thr Cys Lys Val Gln Glu Gln Pro Pro Ala Ile Pro Glu Ala

35

40

45

ctg gcc tgg ccc act cca ccc acc cgc cca gcc ccg gcc ccg tgc cat 314

Leu Ala Trp Pro Thr Pro Pro Thr Arg Pro Ala Pro Ala Pro Cys His

50

55

60

gcc aac acc tct atg gtc acc cac ccg gac ttc gcc acg cag ccg cag 362

Ala Asn Thr Ser Met Val Thr His Pro Asp Phe Ala Thr Gln Pro Gln

65

70

75

cac gtt cag aac ttc ctc ctg tac aga cac tgc cgc cac ttt ccc ctg 410

His Val Gln Asn Phe Leu Leu Tyr Arg His Cys Arg His Phe Pro Leu

80

85

90

ctg cag gac gtg ccc ccc tct aag tgc gcg cag ccg gtc ttc ctg ctg 458

Leu Gln Asp Val Pro Pro Ser Lys Cys Ala Gln Pro Val Phe Leu Leu

95

100

105

110

ctg gtg atc aag tcc tcc cct agc aac tat gtg cgc cgc gag ctg ctg 506

Leu Val Ile Lys Ser Ser Pro Ser Asn Tyr Val Arg Arg Glu Leu Leu

115

120

125

cgg cgc acg tgg ggc cgc gag cgc aag gta cgg ggt ttg cag ctg cgc 554

Arg Arg Thr Trp Gly Arg Glu Arg Lys Val Arg Gly Leu Gln Leu Arg

130

135

140

ctc ctc ttc ctg gtg ggc aca gcc tcc aac ccg cac gag gcc cgc aag 602

Leu Leu Phe Leu Val Gly Thr Ala Ser Asn Pro His Glu Ala Arg Lys

145

150

155

gtc aac cgg ctg ctg gag ctg gag gca cag act cac gga gac atc ctg 650

Val Asn Arg Leu Leu Glu Leu Glu Ala Gln Thr His Gly Asp Ile Leu

160

165

170

cag tgg gac ttc cac gac tcc ttc ttc aac ctc acg ctc aag cag gtc 698

Gln Trp Asp Phe His Asp Ser Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Gln Val

175

180

185

190

ctg ttc tta cag tgg cag gag aca agg tgc gcc aac gcc agc ttc gtg 746

Leu Phe Leu Gln Trp Gln Glu Thr Arg Cys Ala Asn Ala Ser Phe Val

195

200

205

ctc aac ggg gat gat gac gtc ttt gca cac aca gac aac atg gtc ttc 794

Leu Asn Gly Asp Asp Asp Val Phe Ala His Thr Asp Asn Met Val Phe

210

215

220

tac ctg cag gac cat gac cct ggc cgc cac ctc ttc gtg ggg caa ctg 842

Tyr Leu Gln Asp His Asp Pro Gly Arg His Leu Phe Val Gly Gln Leu

225

230

235

atc caa aac gtg ggc ccc atc cgg gct ttt tgg agc aag tac tat gtg 890

Ile Gln Asn Val Gly Pro Ile Arg Ala Phe Trp Ser Lys Tyr Tyr Val

240

245

250

cca gag gtg gtg act cag aat gag cgg tac cca ccc tat tgt ggg ggt 938

Pro Glu Val Val Thr Gln Asn Glu Arg Tyr Pro Pro Tyr Cys Gly Gly

255

260

265

270

ggt ggc ttc ttg ctg tcc cgc ttc acg gcc gct gcc ctg cgc cgt gct 986

Gly Gly Phe Leu Leu Ser Arg Phe Thr Ala Ala Ala Leu Arg Arg Ala

275

280

285

gcc cat gtc ttg gac atc ttc ccc att gat gat gtc ttc ctg ggt atg 1034

Ala His Val Leu Asp Ile Phe Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu Gly Met

290

295

300

tgt ctg gag ctt gag gga ctg aag cct gcc tcc cac agc ggc atc cgc 1082

Cys Leu Glu Leu Glu Gly Leu Lys Pro Ala Ser His Ser Gly Ile Arg

305

310

315

acg tct ggc gtg cgg gct cca tcg caa cac ctg tcc tcc ttt gac ccc 1130

Thr Ser Gly Val Arg Ala Pro Ser Gln His Leu Ser Ser Phe Asp Pro

320

325

330

tgc ttc tac cga gac ctg ctg ctg gtg cac cgc ttc cta cct tat gag 1178

Cys Phe Tyr Arg Asp Leu Leu Leu Val His Arg Phe Leu Pro Tyr Glu

335

340

345

350

atg ctg ctc atg tgg gat gcg ctg aac cag ccc aac ctc acc tgc ggc 1226

Met Leu Leu Met Trp Asp Ala Leu Asn Gln Pro Asn Leu Thr Cys Gly

355

360

365

aat cag aca cag atc tac tgagtcagca tcagggtccc cagcctctgg

1274

Asn Gln Thr Gln Ile Tyr

370

gtcctgttt ccagaggaag gggcgacacc ttcctcccag gaagctgaga cctttgtggt 1334

ctgagcataa gggagtgcc a ggaaggttt gaggtttgat gagtgaatat tctggctggc 1394

gaactcctac acatccttca aaacccacct ggtactgttc cagcatcttc cctggatggc 1454

tggaggaact ccagaaaata tgcattctt tttgtggct gctaattggca gaagtgcctg 1514

tgctagagtt ccaactgttg atgcatccgt cccgtttgag tcaaagtctt acttccctgc 1574

tctcacctac tcacagacgg gatgctaagc agtgcacctg cagtggttta atggcagata 1634

agctccgtct gcagttccag gccagccaga aactcctgig tccacataga gctgacgtga 1694

gaaatatctt tcagcccagg agagaggggt cctgatctta accctttcct gggcttcaga 1754

caactcagaa ggttgggggg ataccagaga ggtgggtgaa taggaccgcc cctccttac 1814

ttgtgggatc aaatgctgta atggtggagg tgtgggcaga ggaggaggc aagtgtcttt 1874

gaaagtgtg agagctcaga gtttctgggg tcttcattag gagccccat cctgtgttc 1934

ccaagaatt cagagaacag cactgggggt ggaatgatct ttaatgggcc caaggccaac 1994

aggcatatgc ctactactg cctggagaag ggagagattc aggtcctcca gcagcctccc 2054

tcaccagta tgttttacag attacggggg gaccgggtga gccagtgacc cctgcagcc 2114

cccagcttca ggcctcagt tctgccagt aagcttcaca ggcattgtga tggggcagcc 2174

ttggggaata taaaattttg tgaagacttg g

2205

<210> 7

<211> 2180

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cgcgagctga gaggagcagg tagaggggca gaggcgggac tgcgtctgg gggagccgcc 60

caggaggctc ctcaggccga cccagaccc tggctggcca gg atg aag tat ctc 114

Met Lys Tyr Leu

1

cgg cac cgg cgg ccc aat gcc acc ctc att ctg gcc atc ggc gct ttc 162

Arg His Arg Arg Pro Asn Ala Thr Leu Ile Leu Ala Ile Gly Ala Phe

5

10

15

20

acc ctc ctc ctc ttc agt ctg cta gtg tca cca ccc acc tgc aag gtc 210

Thr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val Ser Pro Pro Thr Cys Lys Val

25

30

35

cag gag cag cca ccg gcg atc ccc gag gcc ctg gcc tgg ccc act cca 258

Gln Glu Gln Pro Pro Ala Ile Pro Glu Ala Leu Ala Trp Pro Thr Pro

40

45

50

ccc acc cgc cca gcc ccg gcc ccg tgc cat gcc aac acc tct atg gtc 306

Pro Thr Arg Pro Ala Pro Ala Pro Cys His Ala Asn Thr Ser Met Val

55

60

65

acc cac ccg gac ttc gcc acg cag ccg cag cac gtt cag aac ttc ctc 354

Thr His Pro Asp Phe Ala Thr Gln Pro Gln His Val Gln Asn Phe Leu

70

75

80

ctg tac aga cac tgc cgc cac ttt ccc ctg ctg cag gac gtg ccc ccc 402

Leu Tyr Arg His Cys Arg His Phe Pro Leu Leu Gln Asp Val Pro Pro

85

90

95

100

tct aag tgc gcg cag ccg gtc ttc ctg ctg ctg gtg atc aag tcc tcc 450

Ser Lys Cys Ala Gln Pro Val Phe Leu Leu Leu Val Ile Lys Ser Ser

105

110

115

cct agc aac tat gtg cgc cgc gag ctg ctg cgg cgc acg tgg ggc cgc 498

Pro Ser Asn Tyr Val Arg Arg Glu Leu Leu Arg Arg Thr Trp Gly Arg

120

125

130

gag cgc aag gta cgg ggt ttg cag ctg cgc ctc ctc ttc ctg gtg ggc 546

Glu Arg Lys Val Arg Gly Leu Gln Leu Arg Leu Leu Phe Leu Val Gly

135

140

145

aca gcc tcc aac ccg cac gag gcc cgc aag gtc aac cgg ctg ctg gag 594

Thr Ala Ser Asn Pro His Glu Ala Arg Lys Val Asn Arg Leu Leu Glu

150

155

160

ctg gag gca cag act cac gga gac atc ctg cag tgg gac ttc cac gac 642

Leu Glu Ala Gln Thr His Gly Asp Ile Leu Gln Trp Asp Phe His Asp

165

170

175

180

tcc ttc ttc aac ctc acg ctc aag cag gtc ctg ttc tta cag tgg cag 690

Ser Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Gln Val Leu Phe Leu Gln Trp Gln

185

190

195

gag aca agg tgc gcc aac gcc agc ttc gtg ctc aac ggg gat gat gac 738

Glu Thr Arg Cys Ala Asn Ala Ser Phe Val Leu Asn Gly Asp Asp Asp

200

205

210

gtc ttt gca cac aca gac aac atg gtc ttc tac ctg cag gac cat gac 786

Val Phe Ala His Thr Asp Asn Met Val Phe Tyr Leu Gln Asp His Asp

215

220

225

cct ggc cgc cac ctc ttc gtg ggg caa ctg atc caa aac gtg ggc ccc 834

Pro Gly Arg His Leu Phe Val Gly Gln Leu Ile Gln Asn Val Gly Pro

230

235

240

atc cgg gct ttt tgg agc aag tac tat gtg cca gag gtg gtg act cag 882

Ile Arg Ala Phe Trp Ser Lys Tyr Tyr Val Pro Glu Val Val Thr Gln

245

250

255

260

aat gag cgg tac cca ccc tat tgt ggg ggt ggt ggc ttc ttg ctg tcc 930

Asn Glu Arg Tyr Pro Pro Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Phe Leu Leu Ser

265

270

275

cgc ttc acg gcc gct gcc ctg cgc cgt gct gcc cat gtc ttg gac atc 978

Arg Phe Thr Ala Ala Ala Leu Arg Arg Ala Ala His Val Leu Asp Ile

280

285

290

ttc ccc att gat gat gtc ttc ctg ggt atg tgt ctg gag ctt gag gga 1026
 Phe Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu Gly Met Cys Leu Glu Leu Glu Gly

295

300

305

ctg aag cct gcc tcc cac agc ggc atc cgc acg tct ggc gtg cgg gct 1074
 Leu Lys Pro Ala Ser His Ser Gly Ile Arg Thr Ser Gly Val Arg Ala

310

315

320

cca tcg caa cgc ctg tcc tcc ttt gac ccc tgc ttc tac cga gac ctg 1122
 Pro Ser Gln Arg Leu Ser Ser Phe Asp Pro Cys Phe Tyr Arg Asp Leu

325

330

335

340

ctg ctg gtg cac cgc ttc cta cct tat gag atg ctg ctc atg tgg gat 1170
 Leu Leu Val His Arg Phe Leu Pro Tyr Glu Met Leu Leu Met Trp Asp

345

350

355

gcg ctg aac cag ccc aac ctc acc tgc ggc aat cag aca cag atc tac 1218
 Ala Leu Asn Gln Pro Asn Leu Thr Cys Gly Asn Gln Thr Gln Ile Tyr

360

365

370

tgagtcagca tcagggtccc cagcctctgg gctcctgttt ccataggaag gggcgacacc 1278

ttcctccag gaagctgaga cctttgtggt ctgagcataa gggagtgcca gggaaggttt 1338

gaggtttgat gagtgaatat tctggctggc gaactcctac acatccttca aaaccacct 1398

ggtactgttc cagcatcttc cctggatggc tggaggaact ccagaaaata tccatcttct 1458

ttttgtggct gctaattggca gaagtcctg tgctagagtt ccaactgtgg atgcatccgt 1518

cccgtttgag tcaaagtctt acttcctgc tctcacctac tcacagacgg gatgctaagc 1578

agtgcacctg cagtggttta atggcagata agctccgtct gcagttccag gccagccaga 1638

aactcctgtg tccacataga gctgacgtga gaaatactt tcagcccagg agagaggggt 1698

cctgatctta accctttcct gggctcaga caactcagaa ggttgggggg ataccagaga 1758

ggtggtgga taggaccgcc ccttccttac ttgtgggac aaatgctgta atgggtggagg 1818

tgtaggcaga ggaggaggc aagtgtcctt tgaaagtgt gagagctcag agtttctggg 1878

gtcctcatta ggagccccc tccctgtgtt cccaagaat tcagagaaca gcactggggc 1938

tggaatgac tttaatgggc ccaaggccaa caggcatatg cctcactact gcctggagaa 1998

gggagagatt caggtcctcc agcagcctcc ctcaccagt atgttttaca gattacgggg 2058

ggaccgggtg agccagtac cccctgtagc cccagcttc aggcctcagt gtctgccagt 2118

caagcttcac aggcattgtg atggggcagc ctgggggaat ataaaatttt gtgaagactt 2178

gg

2180

<210> 8

<211> 1296

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

cacagcctga gactcatctc gcttcgaccc cgccgccgcc gccgccgcc ggcacctga 60

gcacggagac agtctccagc tgccgttc atg ctt cct ccc cag cct tct gca 112

Met Leu Pro Pro Gln Pro Ser Ala

1

5

gcc cac cag gga agg ggc ggt agg agt ggc ctt tta cca aag gga ccg 160

Ala His Gln Gly Arg Gly Gly Arg Ser Gly Leu Leu Pro Lys Gly Pro

10

15

20

gcg atg ctc tgc agg ctg tgc tgg ctg gtc tcg tac agc ttg gct gtg 208

Ala Met Leu Cys Arg Leu Cys Trp Leu Val Ser Tyr Ser Leu Ala Val

25

30

35

40

ctg ttg ctc ggc tgc ctg ctc ttc ctg agg aag gcg gcc aag ccc gca 256

Leu Leu Leu Gly Cys Leu Leu Phe Leu Arg Lys Ala Ala Lys Pro Ala

45

50

55

gga gac ccc acg gcc cac cag cct ttc tgg gct ccc cca aca ccc cgt 304

Gly Asp Pro Thr Ala His Gln Pro Phe Trp Ala Pro Pro Thr Pro Arg

60

65

70

cac agc cgg tgt cca ccc aac cac aca gtg tct agc gcc tct ctg tcc 352

His Ser Arg Cys Pro Pro Asn His Thr Val Ser Ser Ala Ser Leu Ser

75

80

85

ctg cct agc cgt cac cgt ctc ttc ttg acc tat cgt cac tgc cga aat 400

Leu Pro Ser Arg His Arg Leu Phe Leu Thr Tyr Arg His Cys Arg Asn

90

95

100

ttc tct atc ttg ctg gag cct tca ggc tgt tcc aag gat acc ttc ttg 448

Phe Ser Ile Leu Leu Glu Pro Ser Gly Cys Ser Lys Asp Thr Phe Leu

105

110

115

120

ctc ctg gcc atc aag tca cag cct ggt cac gtg gag cga cgt gcg gct 496

Leu Leu Ala Ile Lys Ser Gln Pro Gly His Val Glu Arg Arg Ala Ala

125

130

135

atc cgc agc acg tgg ggc agg gtg ggg gga tgg gct agg ggc cgg cag 544

Ile Arg Ser Thr Trp Gly Arg Val Gly Gly Trp Ala Arg Gly Arg Gln

140

145

150

ctg aag ctg gtg ttc ctc cta ggg gtg gca gga tcc gct ccc cca gcc 592

Leu Lys Leu Val Phe Leu Leu Gly Val Ala Gly Ser Ala Pro Pro Ala

155

160

165

cag ctg ctg gcc tat gag agt agg gag ttt gat gac atc ctc cag tgg 640

Gln Leu Leu Ala Tyr Glu Ser Arg Glu Phe Asp Asp Ile Leu Gln Trp

170

175

180

gac ttc act gag gac ttc ttc aac ctg acg ctc aag gag ctg cac ctg 688

Asp Phe Thr Glu Asp Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Glu Leu His Leu

185

190

195

200

cag cgc tgg gtg gtg gct gcc tgc ccc cag gcc cat ttc atg cta aag 736

Gln Arg Trp Val Val Ala Ala Cys Pro Gln Ala His Phe Met Leu Lys

205

210

215

gga gat gac gat gtc ttt gtc cac gtc ccc aac gtg tta gag ttc ctg 784

Gly Asp Asp Asp Val Phe Val His Val Pro Asn Val Leu Glu Phe Leu

220

225

230

gat ggc tgg gac cca gcc cag gac ctc ctg gtg gga gat gtc atc cgc 832

Asp Gly Trp Asp Pro Ala Gln Asp Leu Leu Val Gly Asp Val Ile Arg

235

240

245

caa gcc ctg ccc aac agg aac act aag gtc aaa tac ttc atc cca ccc 880

Gln Ala Leu Pro Asn Arg Asn Thr Lys Val Lys Tyr Phe Ile Pro Pro

250

255

260

tca atg tac agg gcc acc cac tac cca ccc tat gct ggt ggg gga gga 928

Ser Met Tyr Arg Ala Thr His Tyr Pro Pro Tyr Ala Gly Gly Gly Gly

265

270

275

280

tat gtc atg tcc aga gcc aca gtg cgg cgc ctc cag gct atc atg gaa 976

Tyr Val Met Ser Arg Ala Thr Val Arg Arg Leu Gln Ala Ile Met Glu

285

290

295

gat gct gaa ctc ttc ccc att gat gat gtc ttt gtg ggt atg tgc ctg 1024

Asp Ala Glu Leu Phe Pro Ile Asp Asp Val Phe Val Gly Met Cys Leu

300

305

310

agg agg ctg ggg ctg agc cct atg cac cat gct ggc ttc aag aca ttt 1072

Arg Arg Leu Gly Leu Ser Pro Met His His Ala Gly Phe Lys Thr Phe

315

320

325

gga atc cgg cgg ccc ctg gac ccc tta gac ccc tgc ctg tat agg ggg 1120

Gly Ile Arg Arg Pro Leu Asp Pro Leu Asp Pro Cys Leu Tyr Arg Gly

330

335

340

ctc ctg ctg gtt cac cgc ctc agc ccc ctc gag atg tgg acc atg tgg 1168

Leu Leu Leu Val His Arg Leu Ser Pro Leu Glu Met Trp Thr Met Trp

345

350

355

360

gca ctg gtg aca gat gag ggg ctc aag tgt gca gct ggc ccc ata ccc 1216

Ala Leu Val Thr Asp Glu Gly Leu Lys Cys Ala Ala Gly Pro Ile Pro

365

370

375

cag cgc tgaaggggtgg gttgggcaac agcctgagag tggactcagt gttgattctc 1272

Gln Arg

tatcgtgatg cgaaattgat gcct

1296

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9

ccggacagat ttaaagactt tctgc

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10

gtagaggcca gagtaaaca cttct

25

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 11

cgtggggcaa ctgatccaaa acg

23

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 12

accaggaag acatcatcaa tggg

24

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 13

cacagcctga gactcatctc gct

23

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 14

aggcatcaat ttcgcatcac gatag

25

<210> 15

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 15

cttttagagca c

11

<210> 16

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 16

ctctaaag

8

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: commercially
available amino acid sequence

<400> 17

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 18

agcttgccgc caccatgcat tttcaagtgc agattttca

39

<210> 19

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 19

gcttcctgct aatcagtgcc tcagtcataa tgtcacgtg

39

<210> 20

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 20

gagattacaa ggacgacgat gacaaggcct acgtag

36

<210> 21

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 21

gaagctgaaa atctgcactt gaaaatgcat ggtggcggca

40

<210> 22

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 22

atctccacgt gacattatga ctgaggcact gattagcag

39

<210> 23

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 23

gtacctacgt aggccttgtc atcgtcgtcc ttgta

35

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 24

cgcggtacct cccacggtc cgtggaccag

30

<210> 25

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 25

atagtttagc ggccgcggaa gggctcagca gcgtcg

36

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 26

cgaggatccg agcagccacc ggcgatccc

29

<210> 27

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 27

gtcgctatgc ggccgctcag tagatctgtg tctgattgcc g

41

<210> 28

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 28

gatcatcgcg aga

13

<210> 29

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 29

agcttctcgc gat

13

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 30

gcccaacagg aacactaagg tcaa

24

<210> 31

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 31

cacggatcca gccagaaaa aaatggaaaa gggga

35

<210> 32

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 32

atccgatagc ggccgcttag cattttaaat gagcactctg caac

44

<210> 33

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 33

ataagatctg caggagaccc cacggcccac c

31

<210> 34

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 34

atagttatgc ggccgcctca ggctgttgcc caaccac

38

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 35

gagaagttct ggaagatata tacc

24

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 36

ctattcaagt aattcaggat gtga

24

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 37

gtgccatgcc aacacctcta tggt

24

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 38

ataccagga agacatcatc aatg

24

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39

gtctcttcttgacctatcgctact

24

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 40

ataccacaaa agacatcatc aatg

24

【図面の簡単な説明】

【図1】は、G4 cDNAの1～477番目までの塩基配列とG4-2 cDNAの1～451番目までの塩基配列を比較した図である。

【図2】は、G4 cDNAの478～1077番目までの塩基配列とG4-2 cDNAの452～1051番目までの塩基配列を比較した図である。

【図3】は、G4 cDNAの1078～1677番目までの塩基配列とG4-2 cDNAの1052～1651番目までの塩基配列を比較した図である。

【図4】は、G4 cDNAの1678～2205番目までの塩基配列とG4-2 cDNAの1652～2180番目までの塩基配列を比較した図である。

【図5】は、G3、G4、G4-2およびG7ポリペプチド、既知のβ1,3-

ガラクトース転移酵素 ($\beta 3 \text{Gal-T}1$ 、 $\beta 3 \text{Gal-T}2$ 、 $\beta 3 \text{Gal-T}3$ 、 $\beta 3 \text{Gal-T}4$ 、 $\beta 3 \text{Gal-T}5$)、ならびに既知の $\beta 1,3\text{-N}$ -アセチルグルコサミン転移酵素 ($\beta 3 \text{GnT}$) のアミノ酸配列を比較したデンドログラムである。相同性がみられた領域のアミノ酸配列のみを用いて比較している。すなわち、細胞質領域、膜結合領域、および幹領域と思われる部分は除いて比較している。

【図6】は、プラスミド pAMo-G3 の造成工程を示す図である。

【図7】は、プラスミド pAMo-G4 の造成工程を示す図である。

【図8】は、プラスミド pAMo-G4-2 の造成工程を示す図である。

【図9】は、プラスミド pAMo-G7 の造成工程を示す図である。

【図10】は、発現プラスミド (pAMo-G3、pAMo-G4、pAMo-G4-2 または pAMo-G7) およびコントロールプラスミド pAMo をそれぞれ Namalwa KJM-1 細胞に導入し、LEA レクチン (太線)、PWM レクチン (太線) または A-PBS (細線) を用いた間接蛍光抗体染色の後、FACS を用いて解析した結果である。

【図11】は、プラスミド pAMoF2-G4 の造成工程を示す図である。

【図12】は、プラスミド pVL1393-F2G4 の造成工程を示す図である。

【図13】は、プラスミド pVL1393-F2G4 由来の組換えウイルスが感染した Sf21 細胞の培養上清から、抗 FLAG M1 アフィニティーゲルを用いて FLAG ペプチド融合分泌型 G4 を精製し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した結果を示した図である (レーン2)。コントロールとして、プラスミド pVL1393 由来の組換えウイルスが感染した Sf21 細胞の培養上清から同様にサンプルを調製し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した (レーン1)。矢印は、生産された分泌型 G4 ポリペプチドの位置を示している。

【図14】は、PCR 法を用いて、35 種のヒト臓器における G3 転写物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCR のサイクル数は 26 である。矢印は目的の増幅断片 (564 bp) の位置を示している。

【図15】は、PCR 法を用いて、ヒトの各種血球細胞株、ヒト多型核白血球 (PMN)、ヒト単球およびヒトリンバ球における G3 転写物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCR のサイクル数は 28 である。矢印は目

的の増幅断片(564bp)の位置を示している。

【図16】は、PCR法を用いて、35種のヒト臓器におけるG4転写物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCRのサイクル数は26である。矢印は目的の増幅断片(202bp)の位置を示している。

【図17】は、PCR法を用いて、ヒトの各種血球細胞株、ヒト多型核白血球(PMN)、ヒト単球およびヒトリンパ球におけるG4転写物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCRのサイクル数は28である。矢印は目的の増幅断片(202bp)の位置を示している。PMNおよびリンパ球でみられるバンドは目的のバンドではない。

【図18】は、PCR法を用いて、ヒトの各種癌細胞株におけるG4転写物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCRのサイクル数は27である。矢印は目的の増幅断片(202bp)の位置を示している。

【図19】は、PCR法を用いて、35種のヒト臓器におけるG7転写物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCRのサイクル数は26である。矢印は目的の増幅断片(456bp)の位置を示している。

【図20】は、PCR法を用いて、ヒトの各種血球細胞株、ヒト多型核白血球(PMN)、ヒト単球およびヒトリンパ球におけるG7転写物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCRのサイクル数は28である。矢印は目的の増幅断片(456bp)の位置を示している。

【図21】は、プラスミドpVL1393-F2G3由来の組換えウイルスが感染したSf21細胞の培養上清から、抗FLAG M1アフィニティーゲルを用いてFLAGペプチド融合分泌型G3を精製し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した結果を示した図である(レーン2)。コントロールとして、プラスミドpVL1393由来の組換えウイルスが感染したSf21細胞の培養上清から同様にしてサンプルを調製し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した(レーン1)。矢印は、生産された分泌型G3ポリペプチドの位置を示している。

【図22】は、プラスミドpVL1393-F2G7由来の組換えウイルスが感染したSf21細胞の培養上清から、抗FLAG M1アフィニティーゲルを用いてFLAGペプチド融合分泌型G7を精製し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し

た結果を示した図である（レーン2）。コントロールとして、プラスミドpVL139 3由来の組換えウイルスが感染したSf21細胞の培養上清から同様にしてサンプルを調製し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した（レーン1）。矢印は、生産された分泌型G7ポリペプチドであると予測される位置を示している。

【符号の説明】

bp: 塩基対 (base pairs)

kb: キロ塩基対 (kilobase pairs)

G418 / Km: トランスポゾン5 (Tn5) 由来G418、カナマイシン耐性遺伝子

Ap: pBR322由来アンピシリン耐性遺伝子

Tc: pBR322由来テトラサイクリン耐性遺伝子

P1: pBR322由来P1プロモーター

Ptk: ヘルペス・シンプレックス・ウイルス (Herpes simplex virus; HSV) チミジンキナーゼ(tk)遺伝子プロモーター

Sp. BG: ラビットβグロビン遺伝子スプライシングシグナル

A.BG: ラビットβグロビン遺伝子ポリA付加シグナル

A. SE: シミアン・ウイルス (simian virus) 40 (SV40) 初期遺伝子ポリ付加シグナル

Atk: ヘルペス・シンプレックス・ウイルス (Herpes simplex virus; HSV) チミジンキナーゼ(tk)遺伝子のポリA付加シグナル

Pmo: モロニー・マウス白血病ウイルスのロング・ターミナル・リピート (long terminal repeat: LTR) プロモーター

EBNA-1: エプシュタイン・パール・ウイルス (Epstein-Barr virus) のEBNA-1遺伝子oriP: エプシュタイン・パール・ウイルス (Epstein-Barr virus)

の複製開始点

S: 免疫グロブリンκのシグナルペプチドをコードする遺伝子部分

F: FLAGペプチドをコードする遺伝子部分

G3: 本発明で取得したβ1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素G3をコー

ドする DNA（全長または部分長）

G 4 : 本発明で取得した β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 G 4 または β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 G 4 - 2 をコードする DNA（全長または部分長）

G 7 : 本発明で取得した β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 G 7 をコードする DNA（全長または部分長）

【書類名】 図面

【図 1】

1st Nucleotide Sequence

File Name : G4 cDNA.

Sequence Size : 2205

2nd Nucleotide Sequence

File Name : G4-2 cDNA

Sequence Size : 2180

```

1'  GGCCAGGAACCCGCAAGGCGCTGCTTGTTCATCTCCAGCCACGGGGAGCTCATTCCCTAG
                                     * * * * *
1"  CGCGAGCTGAGAGGAGCAGGTAGAGGGGCAG

61'  CAGCGGGCCAG---ACCCAAGGAGCCGCCAGGAGGCTCCTCAGGCCGACCCCAGACCCT
      *****
32"  AGGCGGGACTGTCTGCTGTTGGGGAGCCGCCAGGAGGCTCCTCAGGCCGACCCCAGACCCT

118'  GGCTGGCCAGGATGAAGTATCTCCGGCACCGGCGGCCCAATGCCACCCTCATTCTGGCCA
      *****
92"  GGCTGGCCAGGATGAAGTATCTCCGGCACCGGCGGCCCAATGCCACCCTCATTCTGGCCA

178'  TCGGCGCTTTACCCCTCCTCCTCTTTCAGTCTGCTAGTGTACACCACCCACCTGCAAGGTCC
      *****
152"  TCGGCGCTTTACCCCTCCTCCTCTTTCAGTCTGCTAGTGTACACCACCCACCTGCAAGGTCC

238'  AGGAGCAGCCACCGGCGATCCCCGAGGCCCTGGCCTGGCCCACTCCACCCACCCGCCAG
      *****
212"  AGGAGCAGCCACCGGCGATCCCCGAGGCCCTGGCCTGGCCCACTCCACCCACCCGCCAG

298'  CCCC GCCCGTGCCATGCCAACACCTCTATGGTCACCCACCCGACTTCGCCACGCAGC
      *****
272"  CCCC GCCCGTGCCATGCCAACACCTCTATGGTCACCCACCCGACTTCGCCACGCAGC

358'  CGCAGCACGTTTCAGAACTTCCTCCTGTACAGACACTGCCGCCACTTTCCCTGCTGCAGG
      *****
332"  CGCAGCACGTTTCAGAACTTCCTCCTGTACAGACACTGCCGCCACTTTCCCTGCTGCAGG

418'  ACGTGCCCCCTCTAAGTGCGCGCAGCCGGTCTTCTGCTGCTGGTGATCAAGTCCTCCC
      *****
392"  ACGTGCCCCCTCTAAGTGCGCGCAGCCGGTCTTCTGCTGCTGGTGATCAAGTCCTCCC

```

【図 2】

478' CTAGCAACTATGTGCGCCGCGAGCTGCTGCGGCGCACGTGGGGCCGCGAGCGCAAGGTAC

452" CTAGCAACTATGTGCGCCGCGAGCTGCTGCGGCGCACGTGGGGCCGCGAGCGCAAGGTAC

538' GGGGTTTGCAGCTGCGCCTCCTCTTCCTGGTGGGCACAGCCTCCAACCCGCACGAGGCCC

512" GGGGTTTGCAGCTGCGCCTCCTCTTCCTGGTGGGCACAGCCTCCAACCCGCACGAGGCCC

598' GCAAGGTCAACCGGCTGCTGGAGCTGGAGGCACAGACTCACGGAGACATCCTGCAGTGGG

572" GCAAGGTCAACCGGCTGCTGGAGCTGGAGGCACAGACTCACGGAGACATCCTGCAGTGGG

658' ACTTCCACGACTCCTTCTTCAACCTCACGCTCAAGCAGGTCTGTTCTTACAGTGGCAGG

632" ACTTCCACGACTCCTTCTTCAACCTCACGCTCAAGCAGGTCTGTTCTTACAGTGGCAGG

718' AGACAAGGTGCGCCAACGCCAGCTTCGTGCTCAACGGGGATGATGACGTCTTTGCACACA

692" AGACAAGGTGCGCCAACGCCAGCTTCGTGCTCAACGGGGATGATGACGTCTTTGCACACA

778' CAGACAACATGGTCTTCTACCTGCAGGACCATGACCCTGGCCGCCACCTCTTCGTGGGGC

752" CAGACAACATGGTCTTCTACCTGCAGGACCATGACCCTGGCCGCCACCTCTTCGTGGGGC

838' AACTGATCCAAAACGTGGGCCCCATCCGGGCTTTTTGGAGCAAGTACTATGTGCCAGAGG

812" AACTGATCCAAAACGTGGGCCCCATCCGGGCTTTTTGGAGCAAGTACTATGTGCCAGAGG

898' TGGTGA CT CAGAATGAGCGGTACCCACCCTATTGTGGGGGTGGTGGCTTCTTGCTGTCCC

872" TGGTGA CT CAGAATGAGCGGTACCCACCCTATTGTGGGGGTGGTGGCTTCTTGCTGTCCC

958' GCTTCACGGCCGCTGCCCTGCGCCGTGCTGCCCATGTCTTGACATCTTCCCCATTGATG

932" GCTTCACGGCCGCTGCCCTGCGCCGTGCTGCCCATGTCTTGACATCTTCCCCATTGATG

1018' ATGTCTTCCTGGGTATGTGTCTGGAGCTTGAGGGACTGAAGCCTGCCTCCCACAGCGGCA

992" ATGTCTTCCTGGGTATGTGTCTGGAGCTTGAGGGACTGAAGCCTGCCTCCCACAGCGGCA

【図3】

1078' TCCGCACGTCTGGCGTGCGGGCTCCATCGCAACACCTGTCCTCCTTTGACCCCTGCTTCT

 1052" TCCGCACGTCTGGCGTGCGGGCTCCATCGCAACGCCTGTCCTCCTTTGACCCCTGCTTCT

 1138' ACCGAGACCTGCTGCTGGTGCACCGCTTCCTACCTTATGAGATGCTGCTCATGTGGGATG

 1112" ACCGAGACCTGCTGCTGGTGCACCGCTTCCTACCTTATGAGATGCTGCTCATGTGGGATG

 1198' CGCTGAACCAGCCCAACCTCACCTGCGGCAATCAGACACAGATCTACTGAGTCAGCATCA

 1172" CGCTGAACCAGCCCAACCTCACCTGCGGCAATCAGACACAGATCTACTGAGTCAGCATCA

 1258' GGGTCCCCAGCCTCTGGGCTCCTGTTTCCAGAGGAAGGGGCGACACCTTCCTCCCAGGAA

 1232" GGGTCCCCAGCCTCTGGGCTCCTGTTTCCATAGGAAGGGGCGACACCTTCCTCCCAGGAA

 1318' GCTGAGACCTTTGTGGTCTGAGCATAAGGGAGTGCCAGGGAAGGTTTGAGGTTTGATGAG

 1292" GCTGAGACCTTTGTGGTCTGAGCATAAGGGAGTGCCAGGGAAGGTTTGAGGTTTGATGAG

 1378' TGAATATTCTGGCTGGCGAACTCCTACACATCCTTCAAACCCACCTGGTACTGTTCCAG

 1352" TGAATATTCTGGCTGGCGAACTCCTACACATCCTTCAAACCCACCTGGTACTGTTCCAG

 1438' CATCTTCCCTGGATGGCTGGAGGAACTCCAGAAAATATGCATCTTCTTTTGTGGCTGCT

 1412" CATCTTCCCTGGATGGCTGGAGGAACTCCAGAAAATATCCATCTTCTTTTGTGGCTGCT

 1498' AATGGCAGAAGTGCCTGTGCTAGAGTTCCAAGTGTGGATGCATCCGTCCCGTTTGAGTCA

 1472" AATGGCAGAAGTGCCTGTGCTAGAGTTCCAAGTGTGGATGCATCCGTCCCGTTTGAGTCA

 1558' AAGTCTTACTTCCCTGCTCTCACCTACTCACAGACGGGATGCTAAGCAGTGCACCTGCAG

 1532" AAGTCTTACTTCCCTGCTCTCACCTACTCACAGACGGGATGCTAAGCAGTGCACCTGCAG

 1618' TGGTTTAATGGCAGATAAGCTCCGTCTGCAGTTCCAGGCCAGCCAGAACTCCTGTGTCC

 1592" TGGTTTAATGGCAGATAAGCTCCGTCTGCAGTTCCAGGCCAGCCAGAACTCCTGTGTCC

【図 4】

1678' ACATAGAGCTGACGTGAGAAATATCTTTCAGCCCAGGAGAGAGGGGTCTGATCTTAACC

1652" ACATAGAGCTGACGTGAGAAATATCTTTCAGCCCAGGAGAGAGGGGTCTGATCTTAACC

1738' CTTTCCTGGGTCTCAGACAACTCAGAAGGTTGGGGGGATACCAGAGAGGTGGTGAATAG

1712" CTTTCCTGGGTCTCAGACAACTCAGAAGGTTGGGGGGATACCAGAGAGGTGGTGAATAG

1798' GACCGCCCCCTCCTTACTTGTGGGATCAAATGCTGTAATGGTGGAGGTGTGGGCAGAGGA

1772" GACCGCCCCCTCCTTACTTGTGGGATCAAATGCTGTAATGGTGGAGGTGTGGGCAGAGGA

1858' GGGAGGCAAGTGT-CTTTGAAAGTTGTGAGAGCTCAGAGTTTCTGGGGTCTCATTAGGA

1832" GGGAGGCAAGTGTCTTTGAAAGTTGTGAGAGCTCAGAGTTTCTGGGGTCTCATTAGGA

1917' GCCCCATCCCTGTGTTCCCCAAGAATTCAGAGAACAGCACTGGGGCTGGAATGATCTTT

1892" GCCCCATCCCTGTGTTCCCCAAGAATTCAGAGAACAGCACTGGGGCTGGAATGATCTTT

1977' AATGGGCCCCAAGGCCAACAGGCATATGCCTCACTACTGCCTGGAGAAGGGAGAGATTGAG

1952" AATGGGCCCCAAGGCCAACAGGCATATGCCTCACTACTGCCTGGAGAAGGGAGAGATTGAG

2037' GTCCTCCAGCAGCCTCCCTCACCCAGTATGTTTTACAGATTACGGGGGGACCGGGTGAGC

2012" GTCCTCCAGCAGCCTCCCTCACCCAGTATGTTTTACAGATTACGGGGGGACCGGGTGAGC

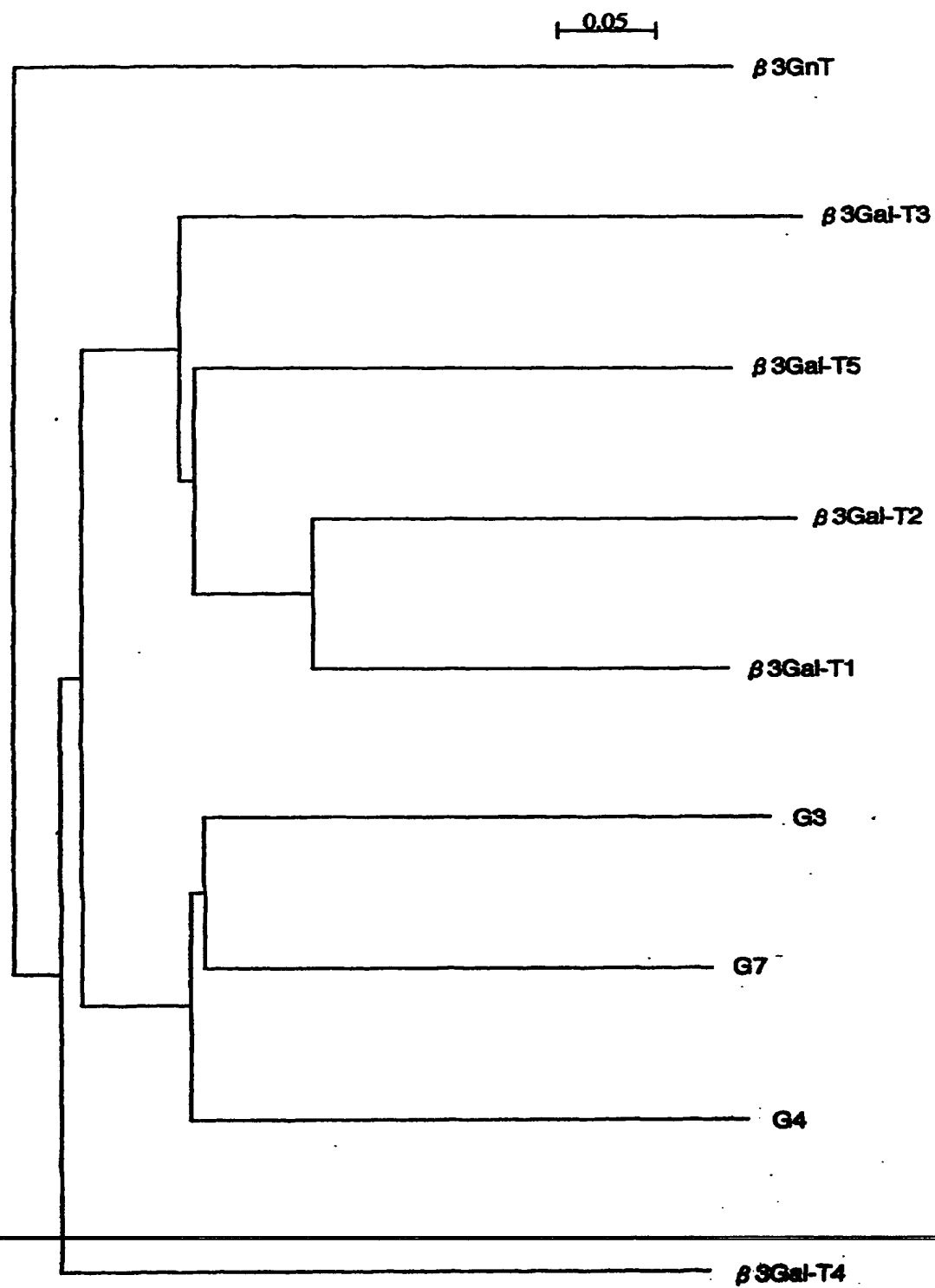
2097' CAGTGACCCCCTGCAGCCCCAGCTTCAGGCCTCAGTGTCTGCCAGTCAAGCTTCACAGG

2072" CAGTGACCCCCTGTAGCCCCAGCTTCAGGCCTCAGTGTCTGCCAGTCAAGCTTCACAGG

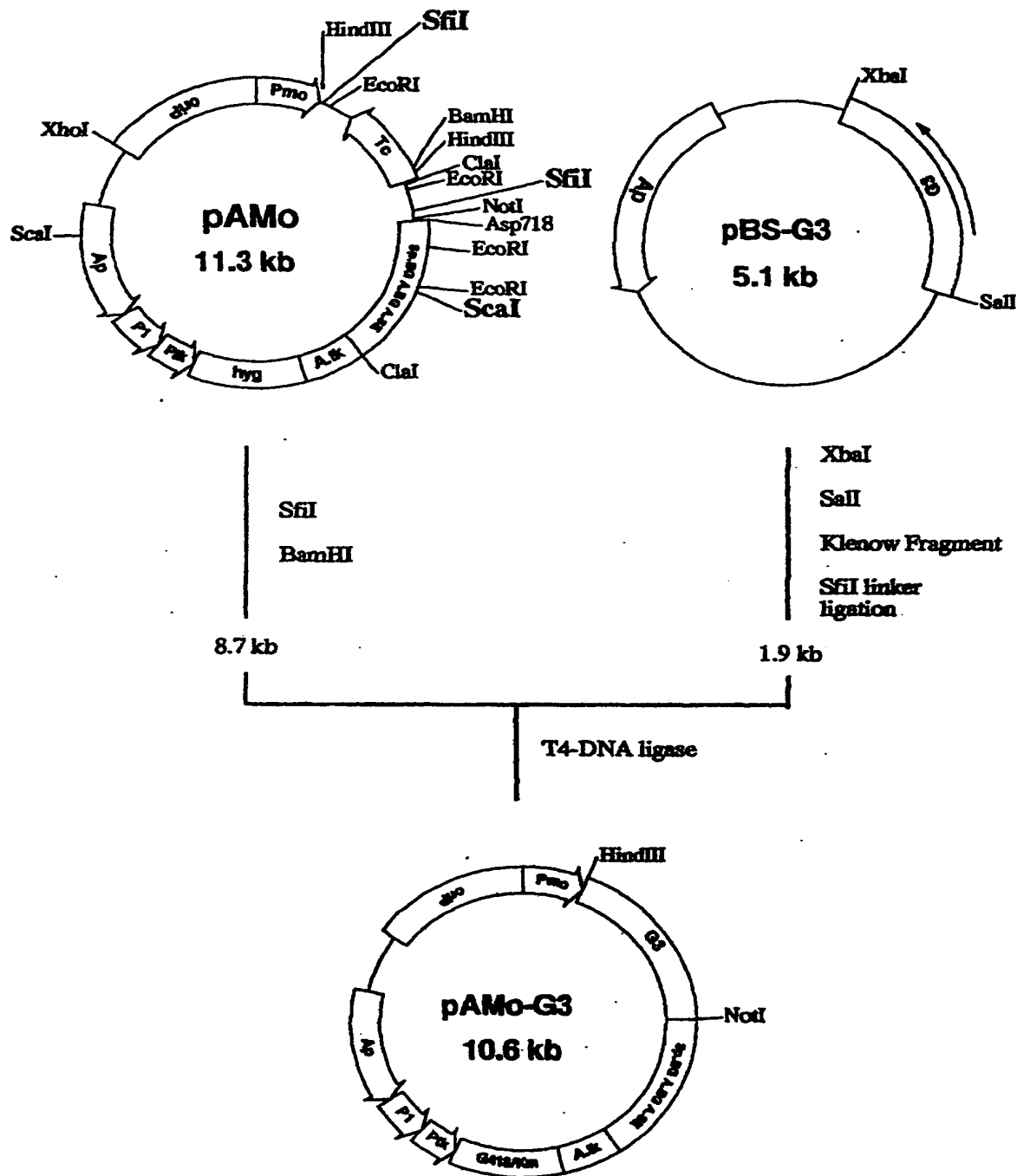
2157' CATTGTGATGGGGCAGCCTTGGGGAATATAAAATTTTGTGAAGACTTGG

2132" CATTGTGATGGGGCAGCCTTGGGGAATATAAAATTTTGTGAAGACTTGG

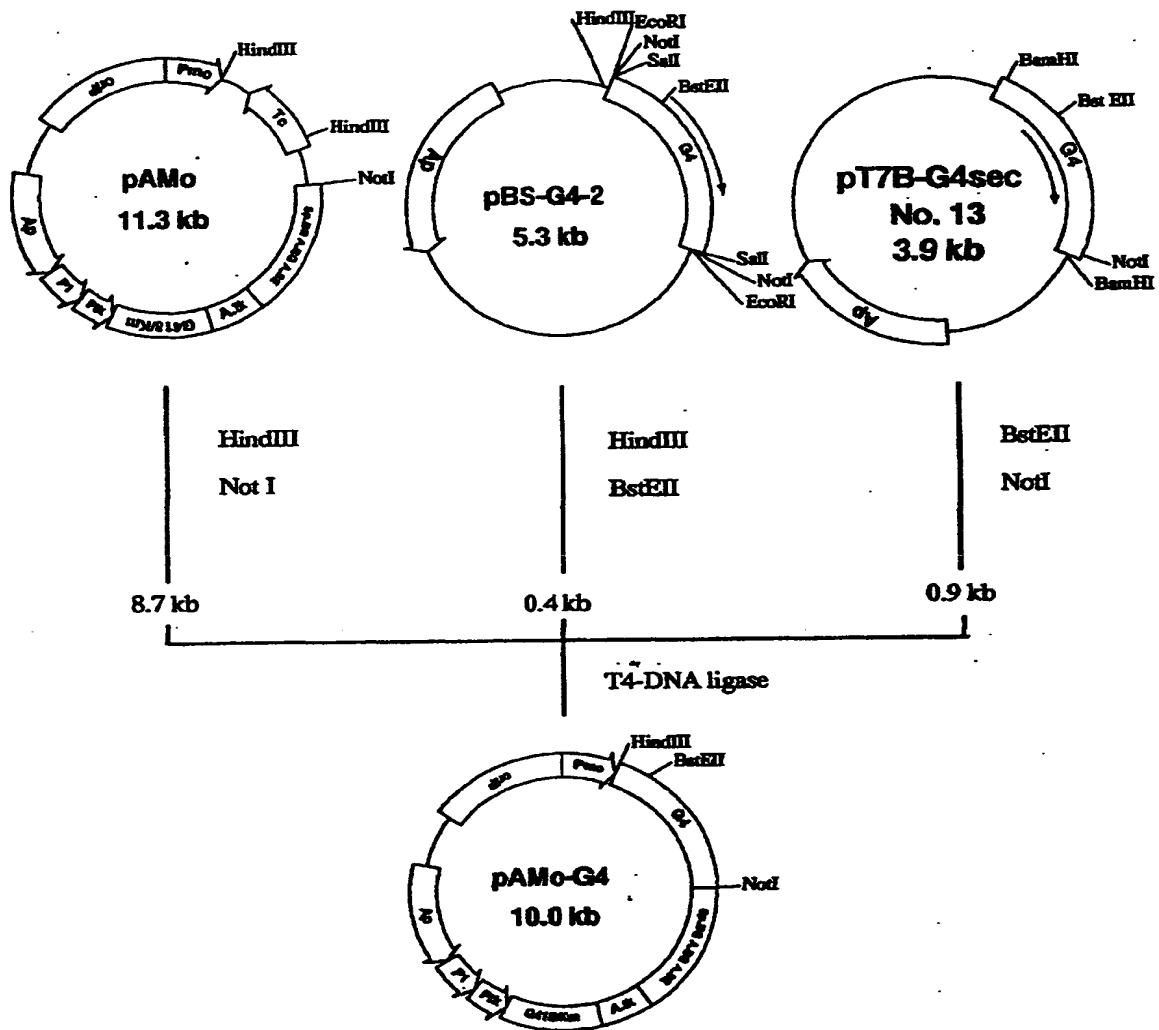
【図 5】



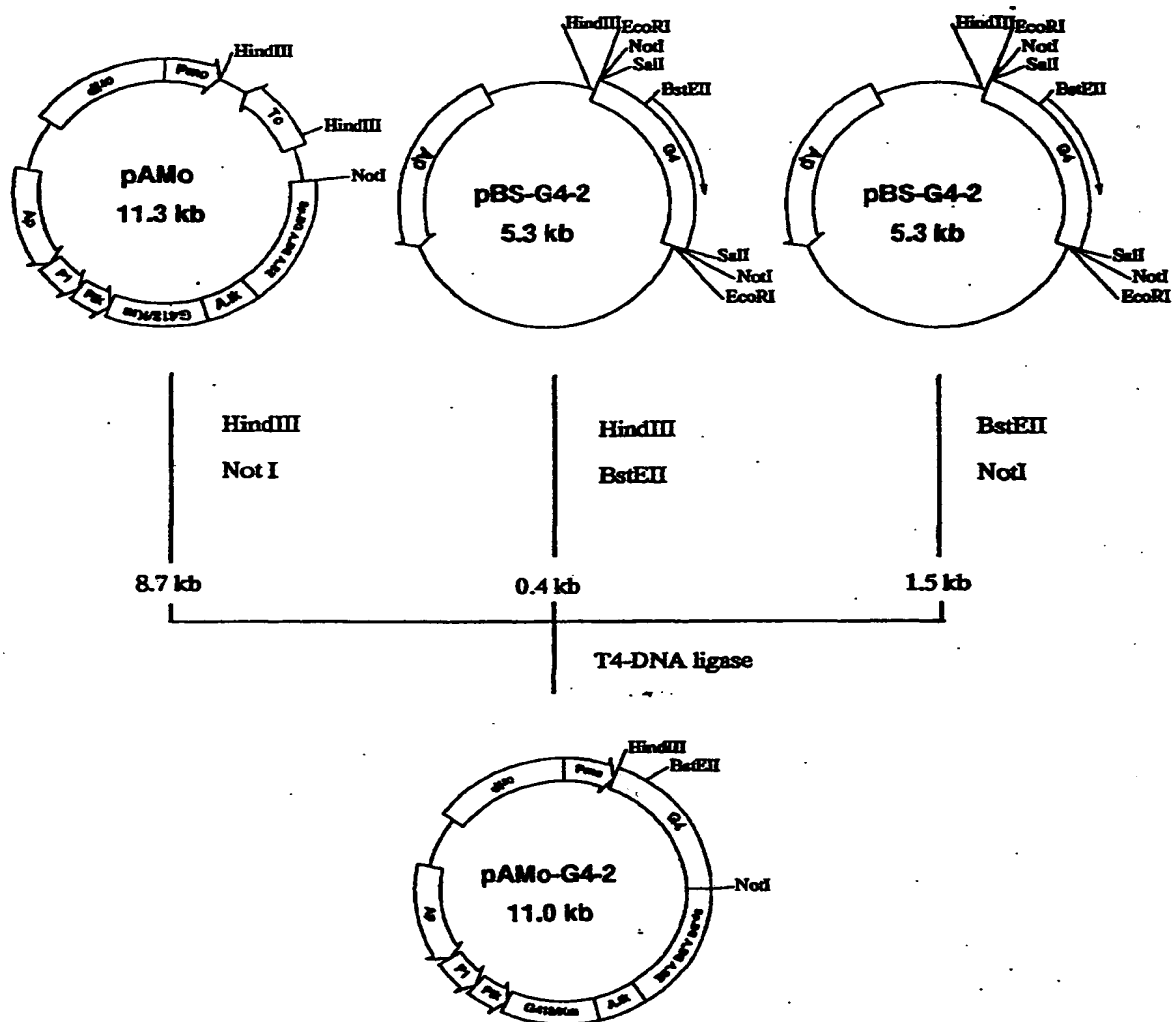
【図6】



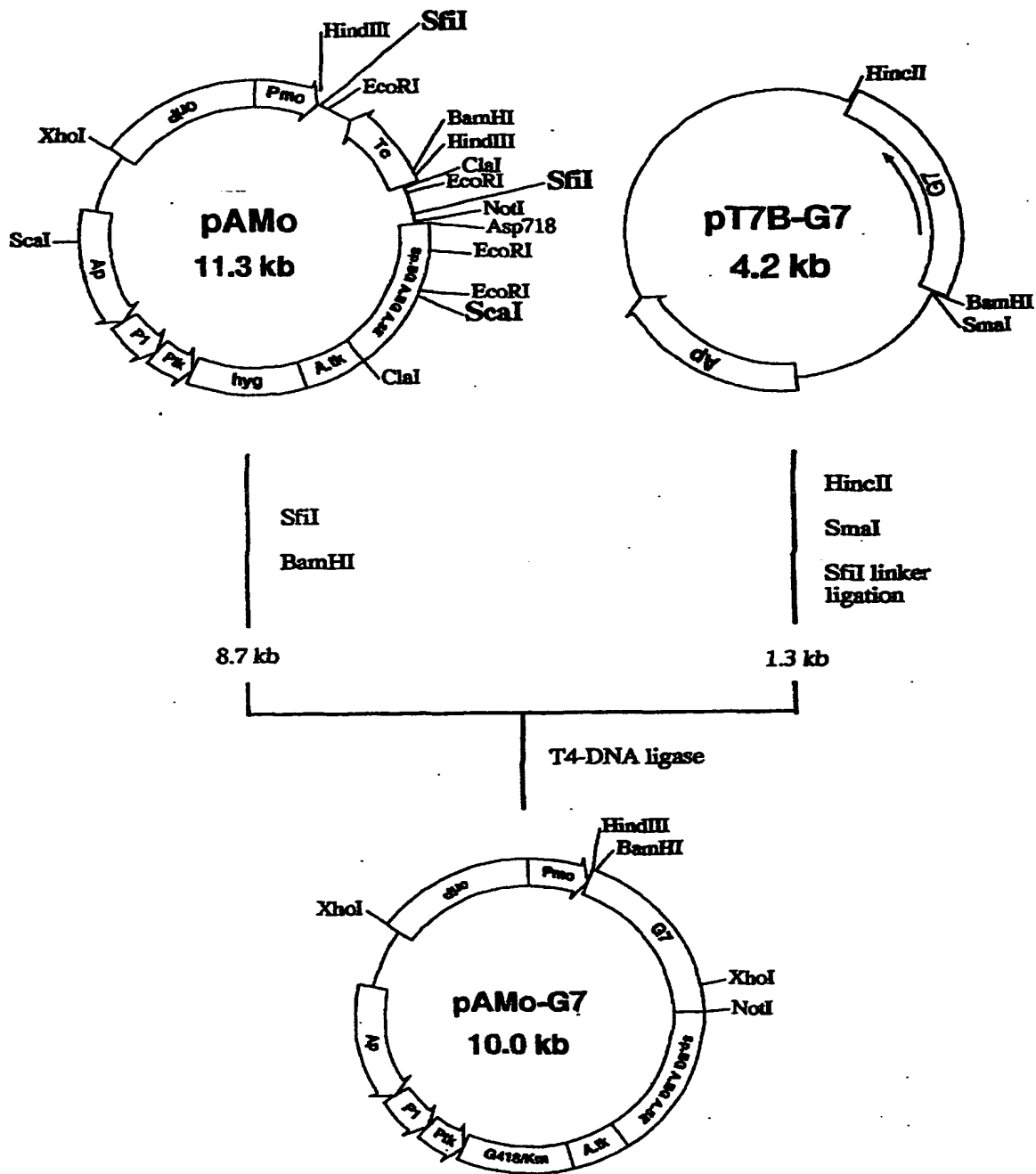
【図 7】



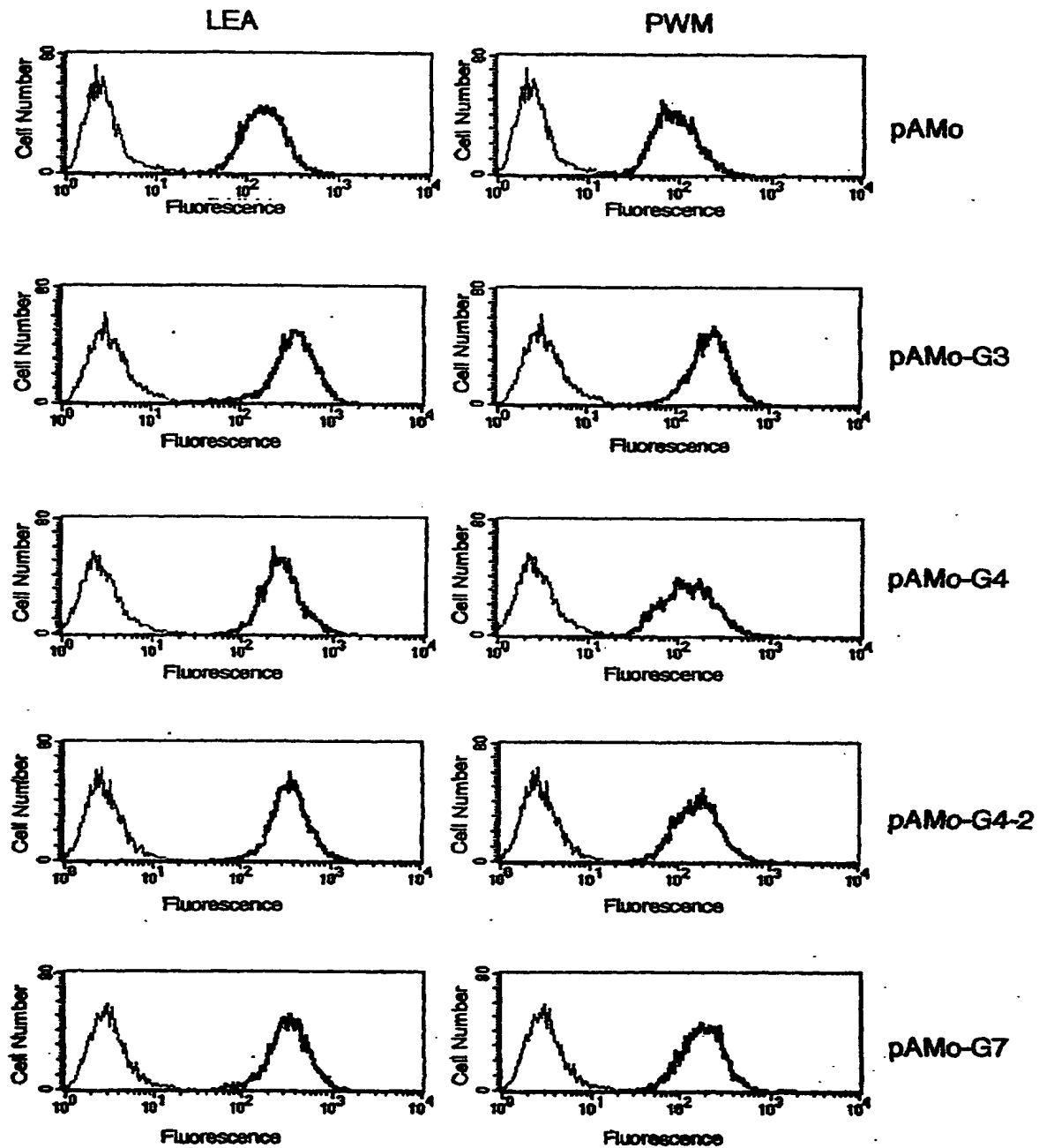
【図 8】



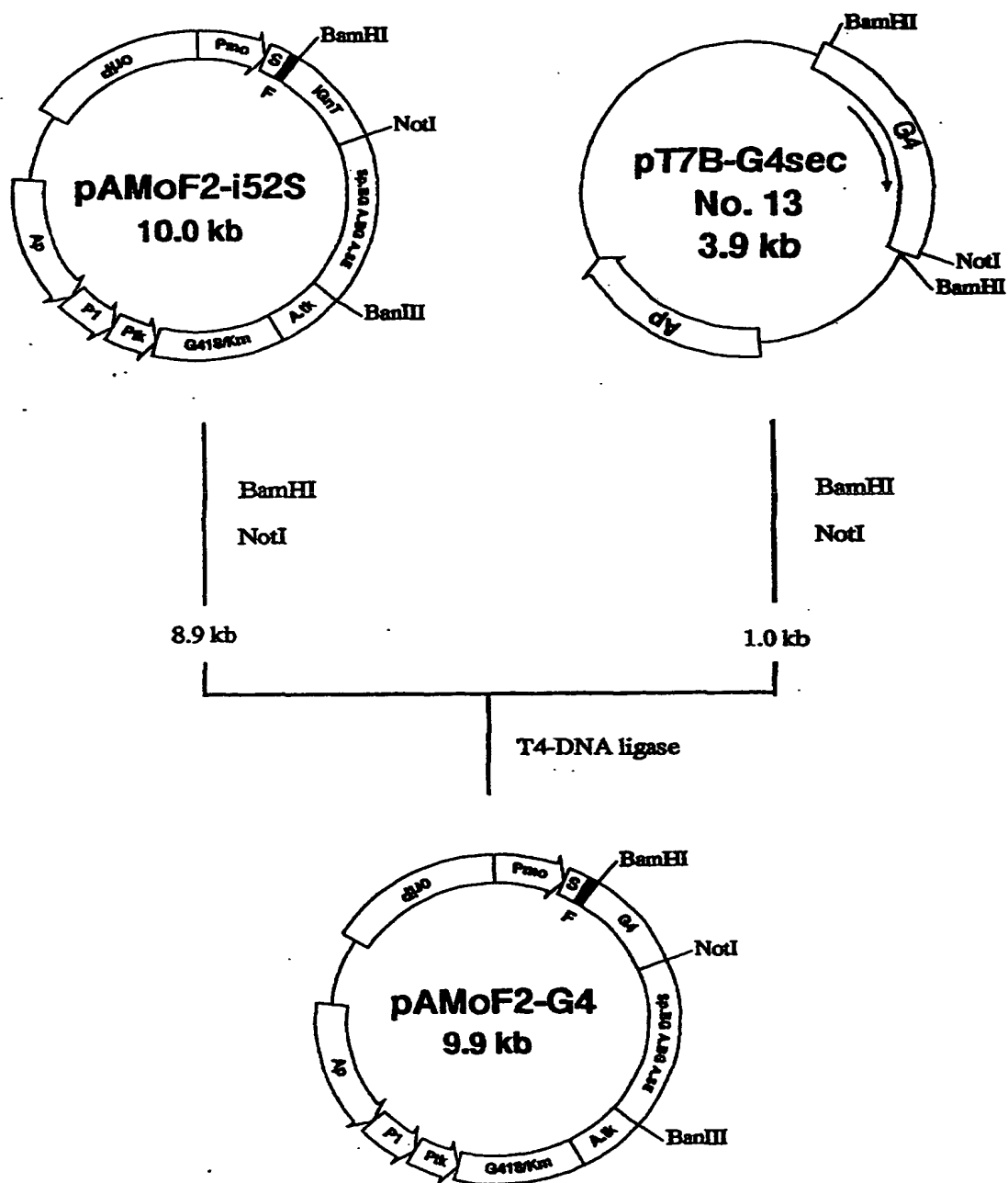
【図 9】



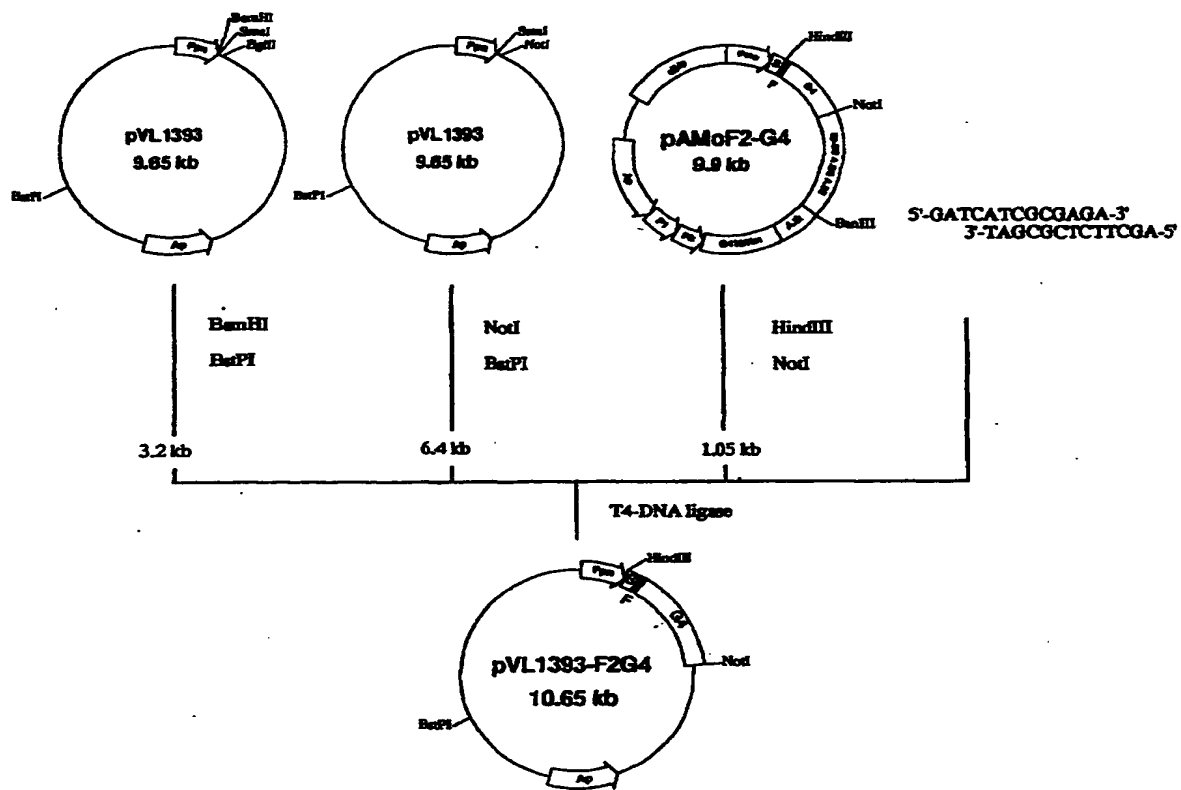
【図10】



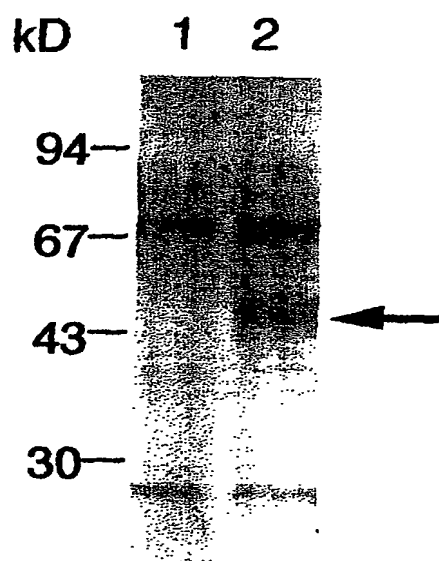
【図 1 1】



【図 12】



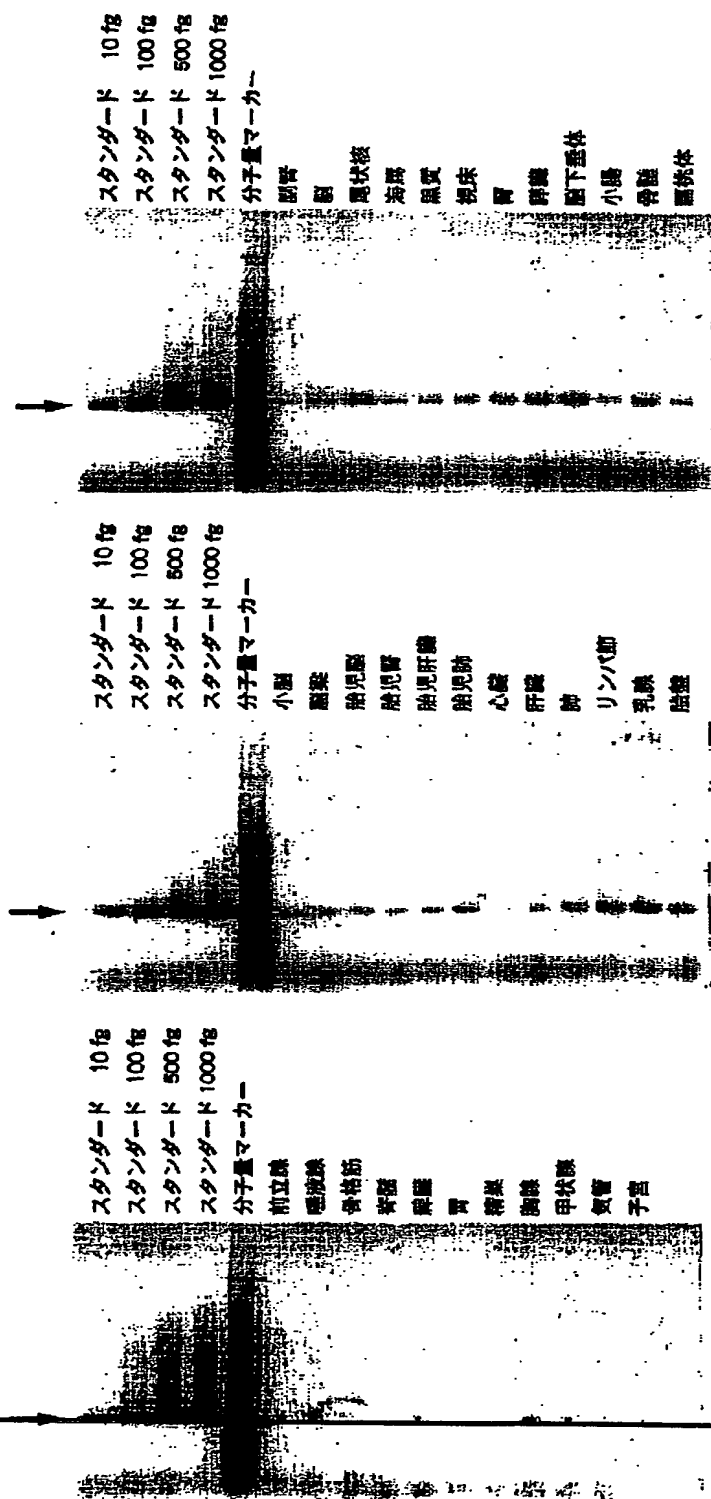
【図 13】



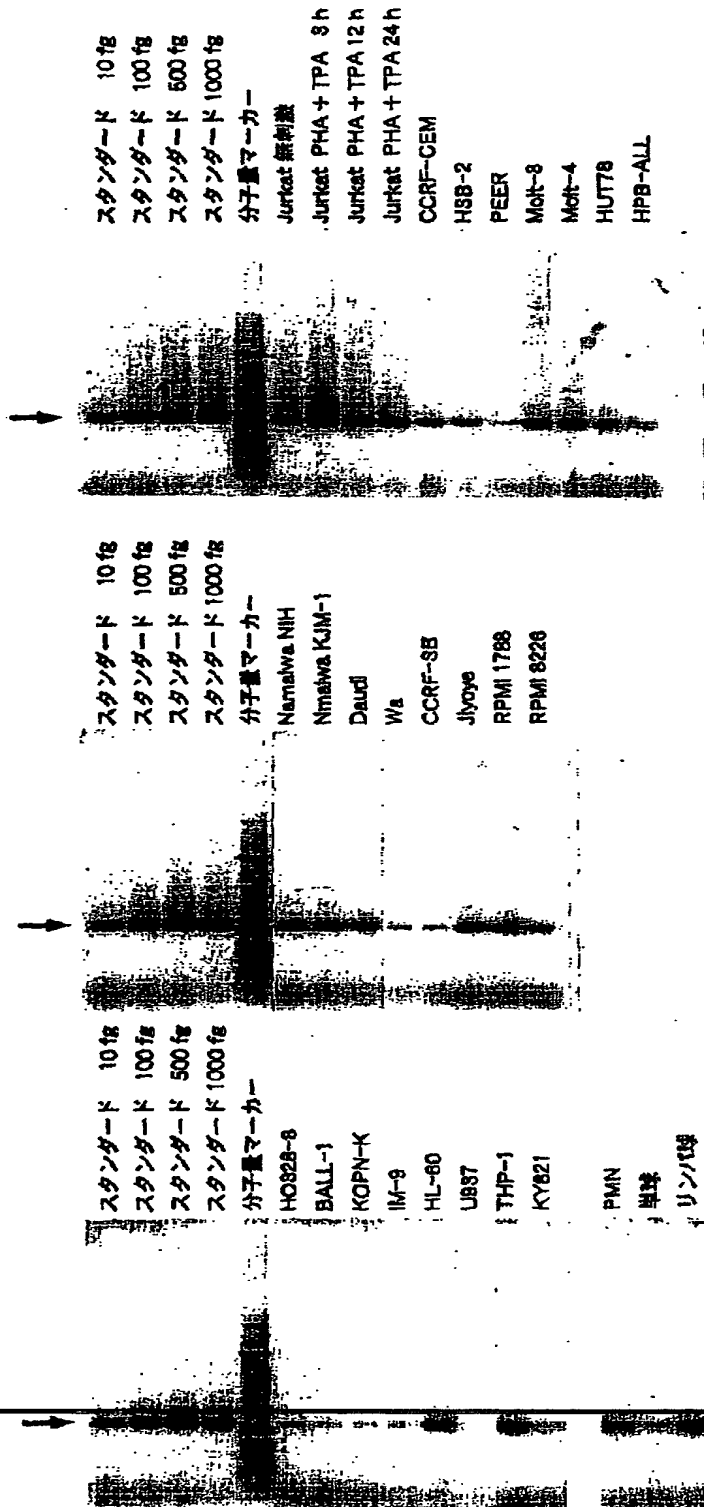
lane 1 Sf21/pVL1393

lane 2 Sf21/pVL1393-F2G4

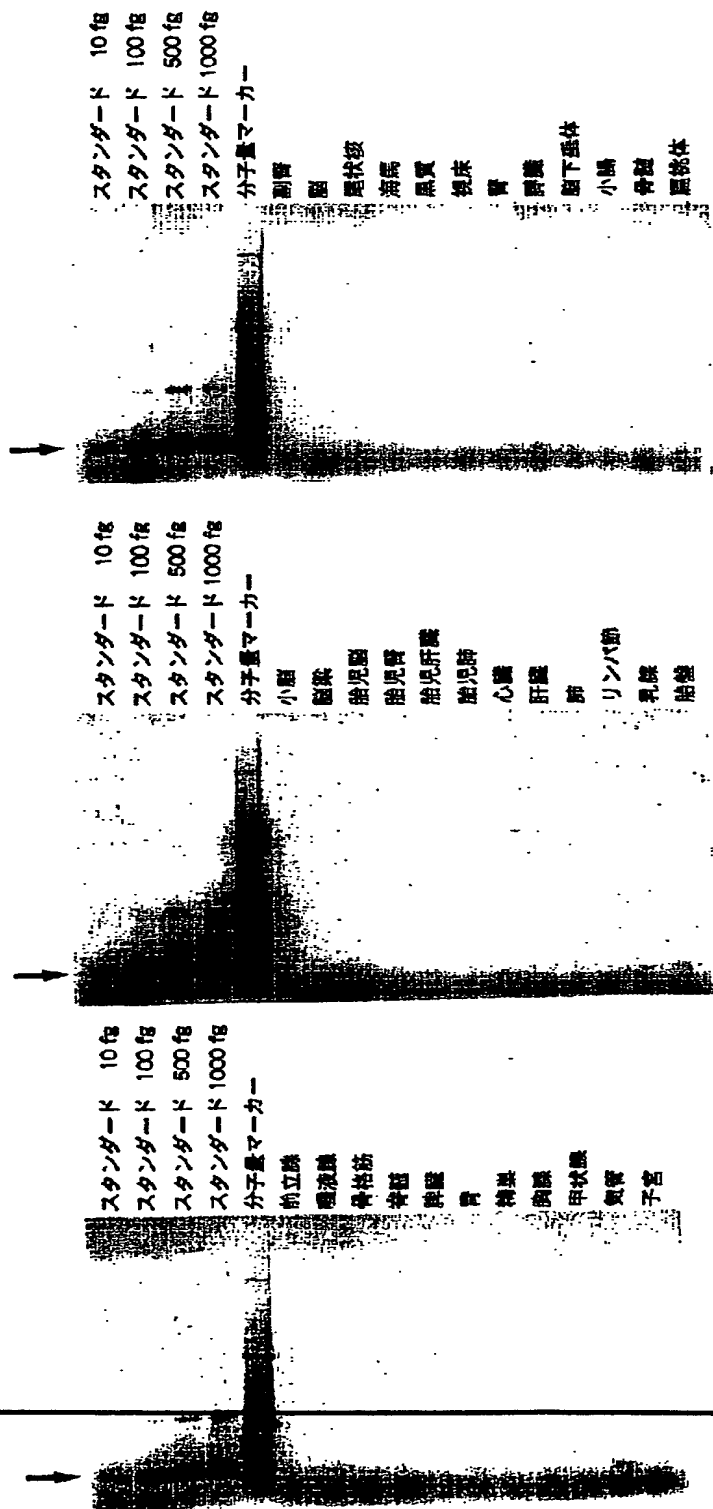
【図14】



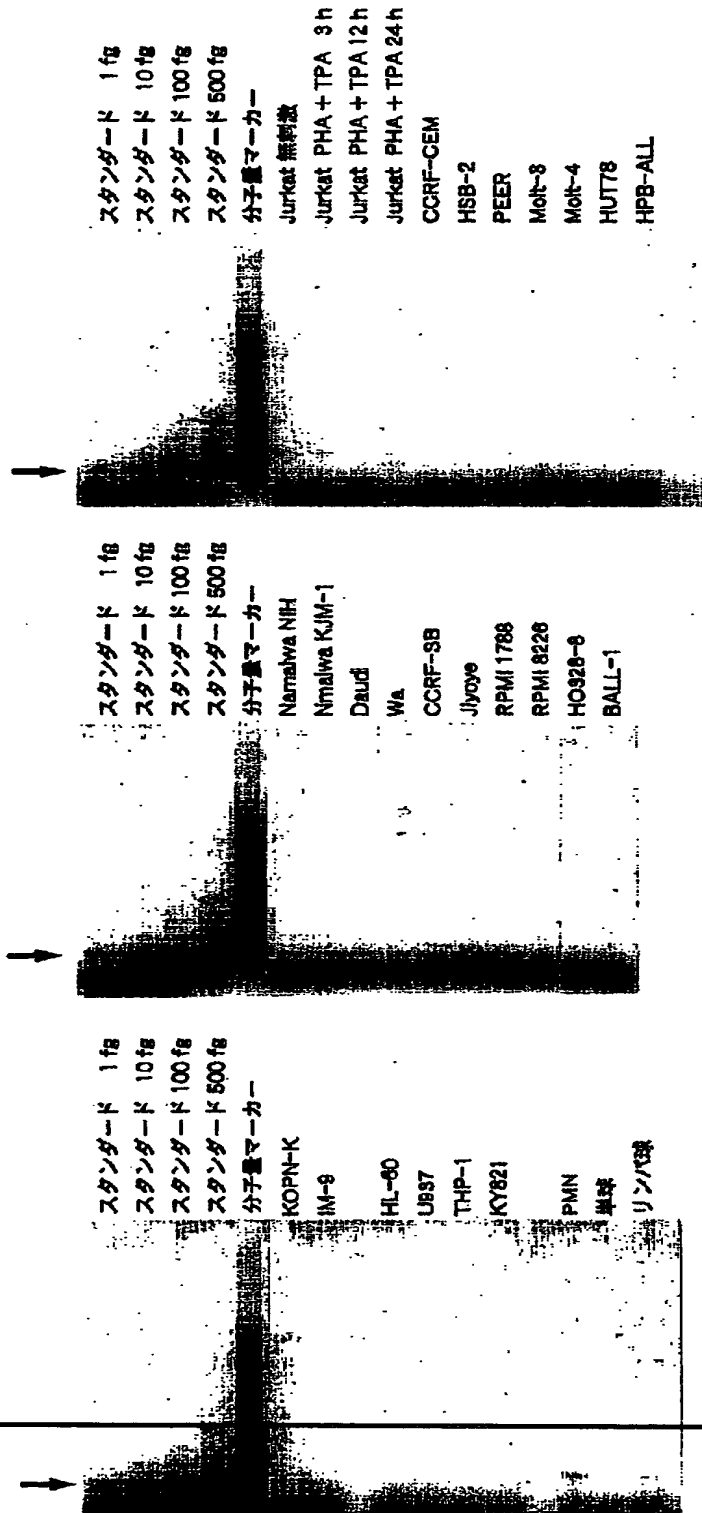
【図15】



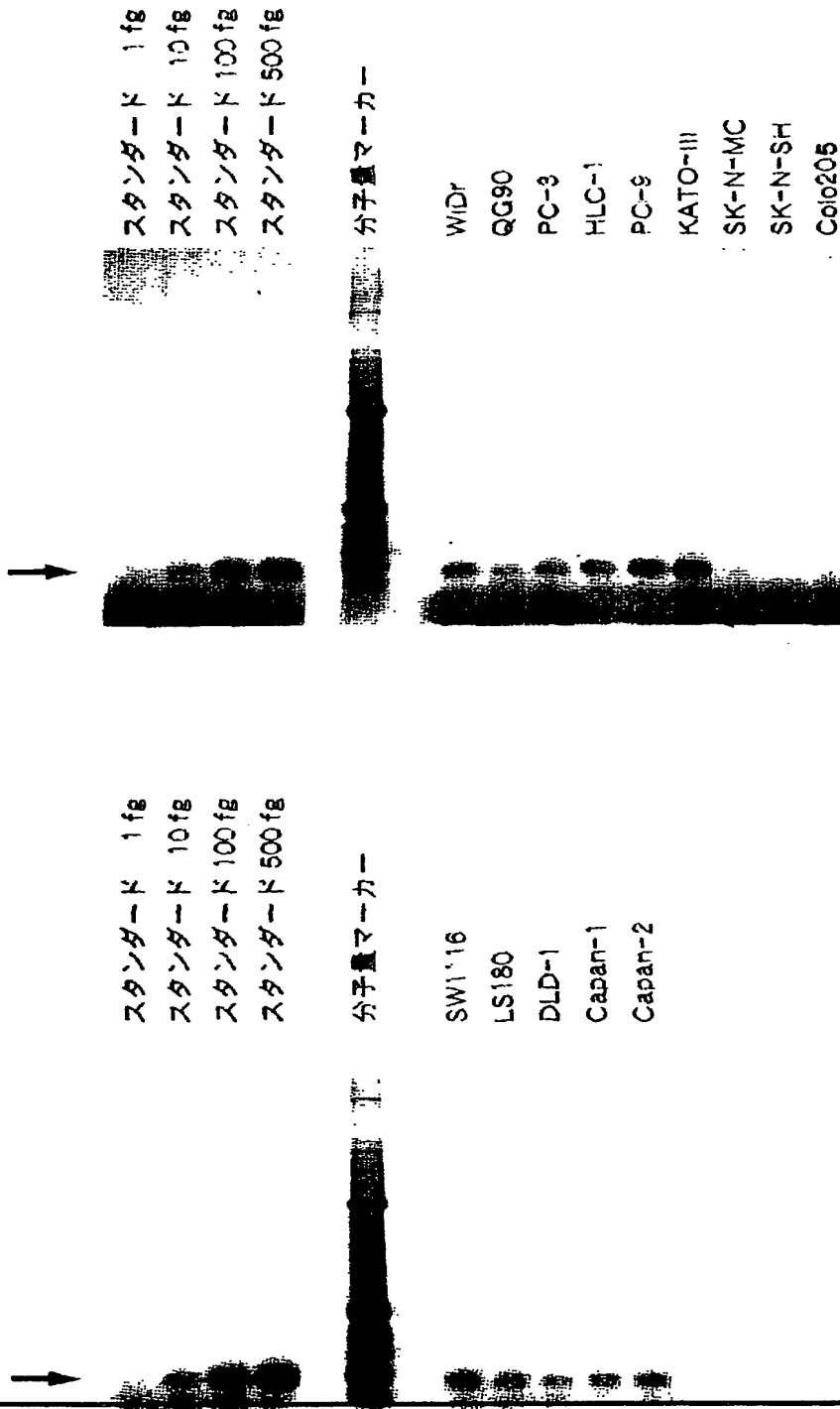
【図 16】



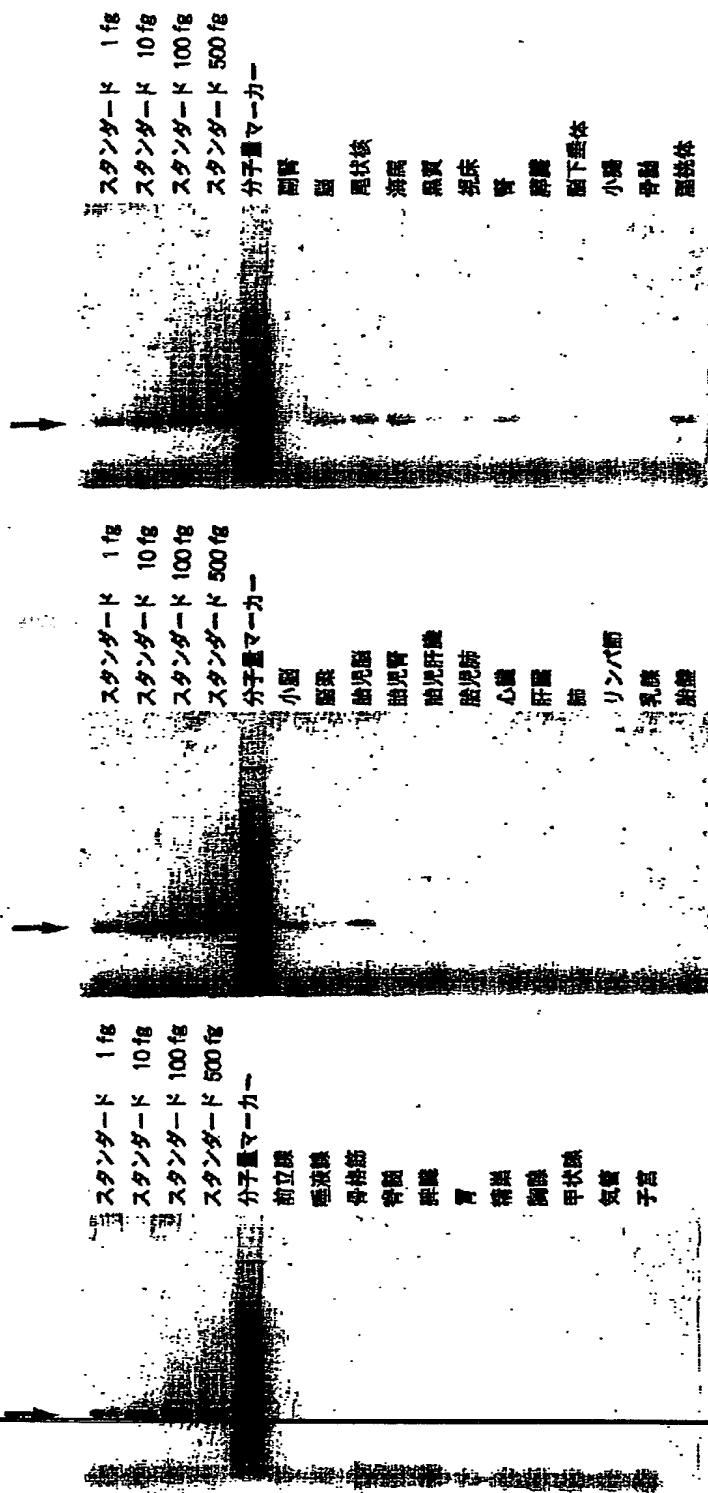
【図 17】



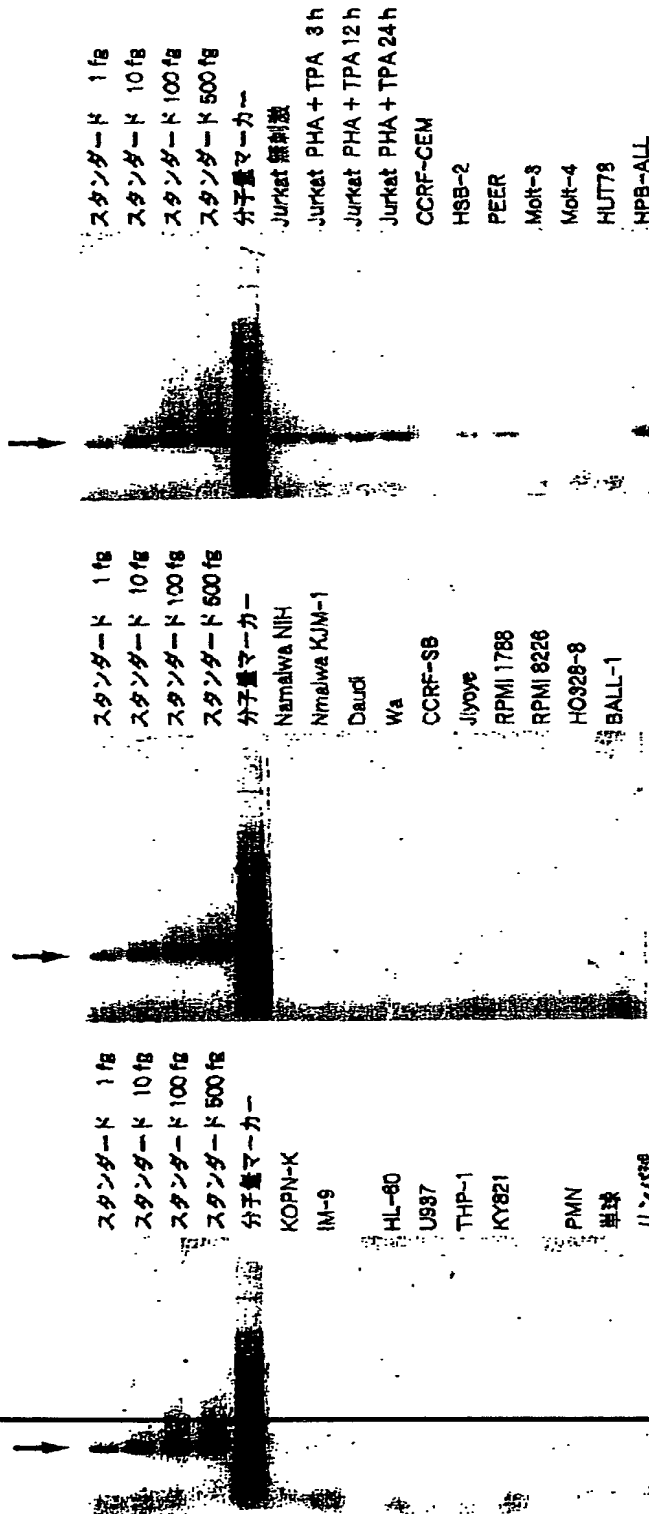
【図18】



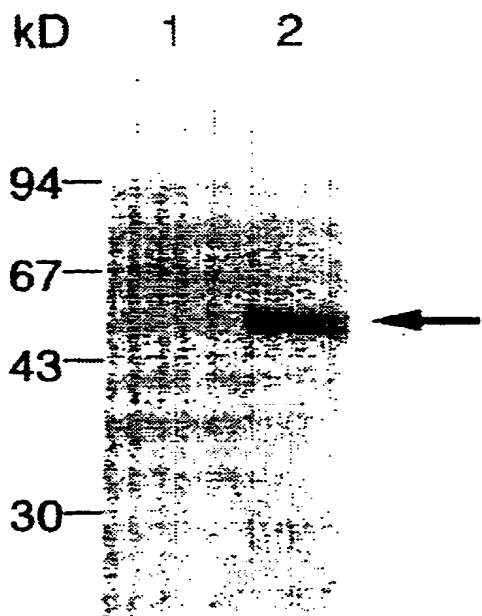
【図19】



【図20】



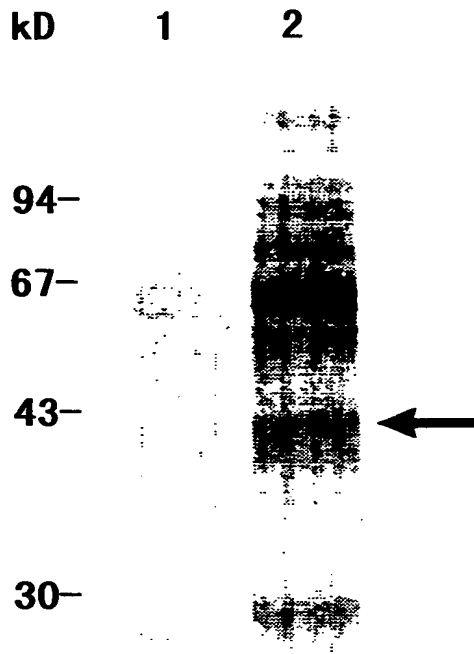
【図 21】



lane 1 Sf21/pVL1393

lane 2 Sf21/pVL1393-F2G3

【図 22】



lane 1 Sf21/pVL1393

lane 2 Sf21/pVL1393-F2G7

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なGal β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有するポリペプチドを利用し、抗炎症、抗感染症、癌転移抑制等の医薬品、乳製品等の食品、および、タンパク質の改善法、炎症性疾患や癌の悪性度の診断法を提供する。

【解決手段】 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAが組み込まれた組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを用いた糖鎖または複合糖質の製造法、該形質転換体を利用した糖鎖または複合糖質の製造法、該ポリペプチドを認識する抗体、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質のスクリーニング法、該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質のスクリーニング法を提供する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
氏 名 協和醗酵工業株式会社